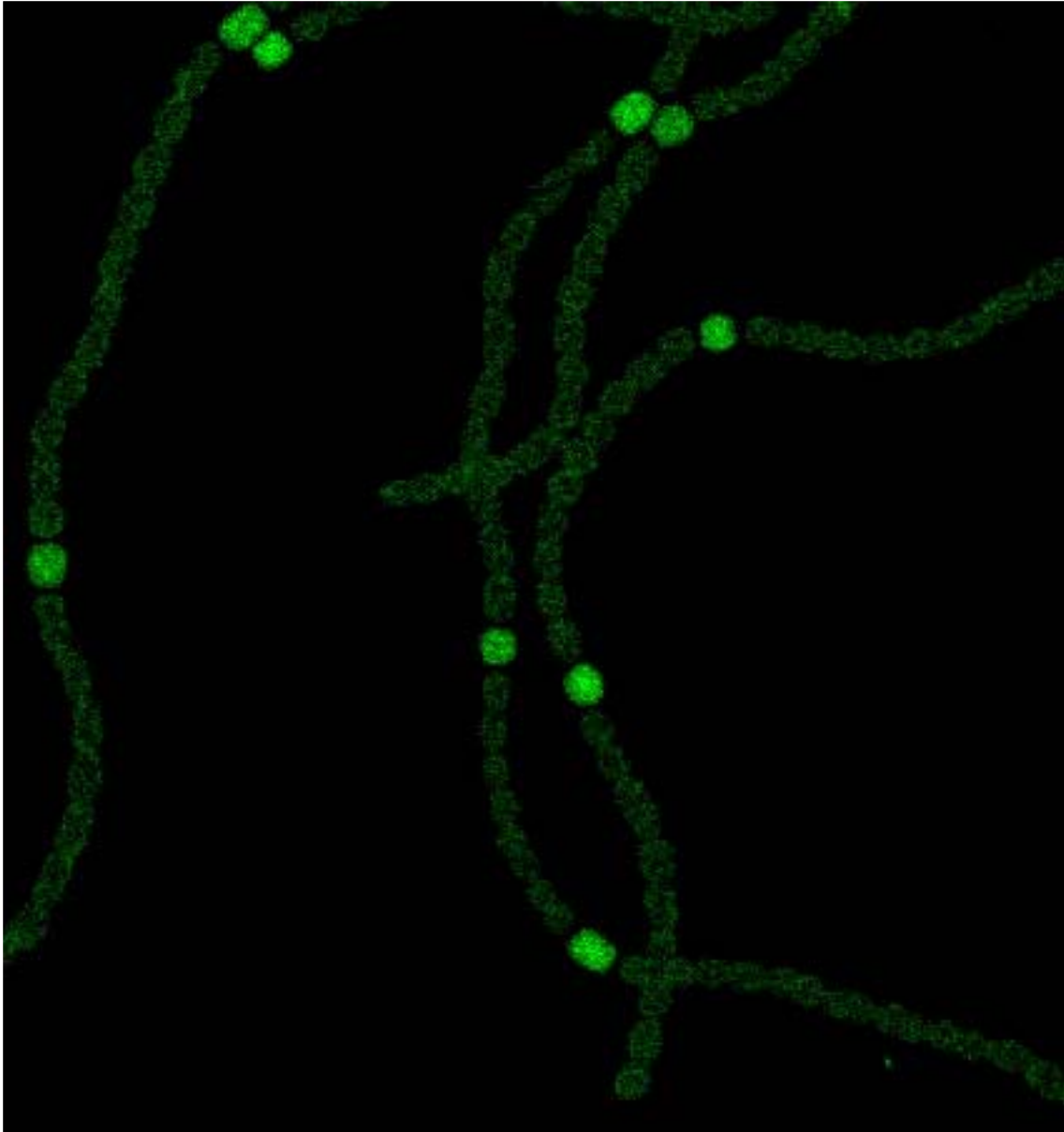


**EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DEL REGULADOR  
TRANSCRIPCIONAL NtcA EN EL DESARROLLO DE LOS  
HETEROCISTOS EN LA CIANOBACTERIA *Anabaena* sp.**



Elvira de Olmedo Verd  
Sevilla, 2008





# **Expresión y función del regulador transcripcional NtcA en el desarrollo de los heterocistos en la cianobacteria *Anabaena* sp.**

Trabajo presentado para optar al grado de  
Doctora en Biología por la Licenciada  
Elvira de Olmedo Verd

Sevilla, Febrero de 2008

Director

Directora

Dr. Enrique Flores García  
Profesor de Investigación del C.S.I.C

Dra. Alicia M<sup>a</sup> Muro Pastor  
Científica Titular del C.S.I.C

Tutor

Dr. José María Romero Rodríguez  
Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular





*A mis padres*



*“...procurando instruirme, no había conseguido  
más provecho que el de descubrir cada vez más  
mi ignorancia”*

*René Descartes*



Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Universidad de Sevilla bajo la dirección de los doctores Enrique Flores García y Alicia M<sup>a</sup> Muro Pastor.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores, Enrique y Alicia, así como a Toñi / la Dra. Antonia Herrero, en primer lugar por confiar en mí y brindarme la posibilidad de formarme bajo el ala de su conocimiento y experiencia. Aparte, he tenido la gran suerte de disfrutar de su apoyo, consejos y comprensión en todo momento siendo un ejemplo en su trato humano y profesionalidad.

Es complicado resumir en un folio a quién le agradecería su aportación en la elaboración de esta tesis doctoral porque en este período de mi vida (no corto) he tenido la posibilidad de conocer a muchas personas que de alguna manera no me han dejado indiferente, aportándome su granito de arena.

Empezaré por la “pandilla de peculiares” que ha constituido el laboratorio 9-10: José Enrique, Ana, Silvia, Javi, Rafa, Virginia, Rocío, Bárbara, Vicente y Victoria (por orden de llegada). También querría mencionar a Ignacio, Rocío Rodríguez y Sunčana que, aunque no son miembros del grupo, están o han estado estrechamente relacionados con nosotros. Gracias por hacer el día a día más agradable con un consejo (o dos, o tres...), una anécdota, una proteína, un chiste, un masaje, un apaño con el ordenador, una charla sobre la vida, un abrazo, una actitud de escucha y comprensión, una sonrisa, unos pajaritos y un largo etcétera hasta completar todos los días desde que entré a formar parte del grupo.

Gracias a Rocío Rodríguez por su disponibilidad y ayuda con la purificación de proteínas, a Alicia Orea por su apoyo técnico en la utilización del microscopio confocal, a Inma por su paciencia con los geles 2D, a Pepa por ese “Elvira cómo vamos, si necesitas algo pídemelo”, al servicio de informática por estar disponible siempre y a Martín por la cantidad de veces que me ha impreso las diferentes versiones de la tesis. Gracias a Ana, Javi, Luis y Eduardo por permitirme estar un ratito más en la biblioteca y a Maribel por dejarme colonizarla. Siguiendo con el ámbito de la tesis/biblioteca quiero mencionar a mis compañeros de batalla en la última etapa, Juan, Esther, Javi, Rosana, Pablo, Carla y Rebeca con los que he compartido la experiencia de la escritura de una tesis.

A ese otro grupo de peculiares con los que he vivido tan buenos y enriquecedores momentos en viajes, cenas, “gymkhanas”, conversaciones sobre “todo y nada”, compuesto por Alberto, Manolo, Luci, Carla, Rocío Drake, Lidia y Jero. A Raulillo por su risa y las charlas entre experimento y experimento. A mi compañera de inglés favorita, María, por ser como es y por esa comprensión mutua que sólo nosotras entendemos. A Carla por todo, pero principalmente por su vitalidad, positivismo, risa y ese afán de superación por el que nada se le resiste, del cual intento contagiarme cada día. A Cristina, Jorge, José Manuel, Maribel, Mario, Leticia, Rosi... y así podría seguir nombrando una a una a todas las personas del IBVF, por un “buenos días”, un “cómo te va”, “unas risas en el comedor”....

Gracias a mis niñas, Ana, Gracia y Marta (y sus respectivos: Feli, Tacho y Miguel Ángel) por escucharme, aconsejarme y arroparme en todo momento. A Maca por estar pendiente de mí y animarme desde la experiencia. A Alicia Vizuete, Loreto y Raquel que, aunque no entendían muy bien las horas y horas que necesitaba de estudio, siempre tenían una palabra de ánimo.

Remontándome a los inicios de la tesis quiero mencionar a Laura Serrano que me “encauzó” en la rama de la microbiología y biología molecular, así como a Marisa, Vero, Alicia Arévalo y Marta Reina que fueron de especial importancia durante el período del IRNASE.

Por último quisiera dar las gracias a mi familia. A mis padres por quererme tanto y hacerme la vida lo más fácil posible. A mis abuelos y hermanos, Margarita, Lucía y Juan Luis, por apoyarme cada uno a su manera.

A todos un “enorme” gracias.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	X
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. LAS CIANOBACTERIAS	3
1.2. LOS HETEROCISTOS	6
1.2.1. FIJACIÓN DE NITRÓGENO	7
1.2.2. MORFOLOGÍA Y METABOLISMO	9
1.2.2.1. Adaptaciones estructurales	10
1.2.2.2. Adaptaciones metabólicas	11
1.2.3. REGULACIÓN DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN	16
1.3. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO	25
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	29
2.1.1. CIANOBACTERIAS	29
2.1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas	29
2.1.1.2. Medios y condiciones de cultivo	30
2.1.1.3. Método de recogida y lavado de células	31
2.1.1.4. Experimentos de inducción sincrónica de desarrollo de heterocistos	31
2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	32
2.1.2.1. Estirpes empleadas	32
2.1.2.2. Medios y condiciones de cultivo	32
2.1.2.3. Método de recogida de células	33
2.2. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA	33
2.2.1. PLÁSMIDOS UTILIZADOS	33
2.2.1.1. Plásmidos no contruidos en este trabajo	33
2.2.1.2. Plásmidos contruidos en este trabajo	35
2.2.2. AISLAMIENTO DE DNA	37
2.2.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	37
2.2.2.2. Aislamiento de DNA total de cianobacterias	37
2.2.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA	38

2.2.4. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA	38
2.2.5. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA	38
2.2.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA DNA POLIMERASA (PCR)	38
2.2.6.1. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa	38
2.2.6.2. Procedimiento del "Megacebador" para introducir alteraciones de secuencia en el DNA	42
2.2.7. DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE DNA MEDIANTE HIBRIDACIÓN EN FILTRO CON SONDA RADIATIVA (ANÁLISIS DE SOUTHERN)	43
2.2.7.1. Transferencia de DNA de geles de agarosa a filtros de nylon	43
2.2.7.2. Hibridación de DNA con sondas radiactivas	43
2.2.7.3. Detección de la radiactividad	43
2.2.8. SECUENCIACIÓN DEL DNA	44
2.2.8.1. Reacción de secuenciación	44
2.2.8.2. Electroforesis vertical de alta resolución en geles de urea-poliacrilamida	44
2.2.9. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL DNA	45
2.2.9.1. Restricción del DNA	45
2.2.9.2. Desfosforilación del DNA	45
2.2.9.3. Relleno de extremos 3' recesivos	45
2.2.9.4. Ligación del DNA	45
2.2.9.5. Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA	46
A. Marcaje uniforme de fragmentos de DNA	46
B. Marcaje en los extremos 3' recesivos de moléculas de DNA	46
C. Marcaje en los extremos 5' de oligonucleótidos o fragmentos de DNA generados por PCR	46
2.3. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA	47
2.3.1 AISLAMIENTO DE RNA	47
2.3.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RNA	47
2.3.3 ELECTROFORESIS DE RNA EN GELES DE AGAROSA	48
2.3.4 DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE RNA MEDIANTE HIBRIDACIÓN EN FILTRO CON SONDA RADIATIVA (ANÁLISIS DE NORTHERN)	48
2.3.4.1. Transferencia de RNA de geles de agarosa a filtros de nylon	48
2.3.4.2. Hibridación de RNA con sondas radiactivas	48
2.3.4.3. Detección de la radiactividad	49
2.3.5 ENSAYO DE EXTENSIÓN DE CEBADOR	49
2.4. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	50
2.4.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES CIANOBACTERIANOS	50



2.4.1.1. Rotura con perlas de vidrio y TCA	50
2.4.1.2. Rotura con prensa de French	50
2.4.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	51
2.4.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR HEPARINA	51
2.4.4. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA NtcA RECOMBINANTE	52
2.4.4.1. Purificación mediante cromatografía de afinidad por heparina	52
A. Preparación del extracto	52
B. Cromatografía de afinidad	52
C. Diálisis de la proteína purificada	53
2.4.4.2. Purificación mediante cromatografía de afinidad por níquel	53
2.4.5. ELECTROFORESIS ANALÍTICA EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA	53
2.4.6. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	54
2.4.7. TINCIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA	54
2.4.7.1. Tinción con azul de Coomassie R-250	54
2.4.7.2. Tinción con nitrato de plata	55
2.4.8. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A FILTROS DE NITROCELULOSA Y DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS (ANÁLISIS DE WESTERN)	55
2.4.9. HUELLA PEPTÍDICA	56
2.5. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DNA-PROTEÍNA	56
2.5.1. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL	56
2.5.2. ENSAYOS DE PROTECCIÓN FRENTE A LA DEGRADACIÓN POR DNasa I	57
2.6. ENSAYO DE ACTIVIDAD NITROGENASA	57
2.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA	58
2.8. MÉTODOS GENÉTICOS	58
2.8.1. TRANSFERENCIA DE DNA A <i>E. coli</i> MEDIANTE TRANSFORMACIÓN	58
2.8.2. TRANSFERENCIA DE DNA A <i>Anabaena</i> sp. MEDIANTE CONJUGACIÓN	59
2.9. MICROSCOPIA CONFOCAL LÁSER PARA LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA TESTIGO GFP	59
2.10. TINCIÓN DE PROHETEROCISTOS Y HETEROCISTOS CON AZUL ALCIAN	60
2.11. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE DNA Y PROTEÍNAS	60
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
3.1. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE NtcA y HetR EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL DESARROLLO DE HETEROCISTOS	63

3.1.1. CONSTRUCCIÓN DE LAS ESTIRPES DERIVADAS DE <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 QUE SOBREEXPRESAN <i>ntcA</i>	63
3.1.2. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>ntcA</i> EN LAS ESTIRPES CSEL1 Y CSEL2	64
3.1.2.1. Niveles de transcrito <i>ntcA</i> y determinación del extremo 5' de los transcritos	64
3.1.2.2. Niveles de proteína NtcA en las estirpes CSEL1 y CSEL2	69
3.1.3. FENOTIPO DE LAS ESTIRPES QUE SOBREEXPRESAN <i>ntcA</i> : CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD NITROGENASA	69
3.1.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL DESARROLLO DEL HETEROCISTO EN LAS ESTIRPES CSEL1 Y CSEL2	71
3.1.5. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN SOBRE <i>ntcA</i> EN LA REORDENACIÓN DE LOS OPERONES <i>nifHDK</i> Y <i>nifB-fdxN-nifS-nifU</i>	74
3.1.6. EXPRESIÓN DE OTROS GENES REGULADOS POR NITRÓGENO EN LA ESTIRPE CSEL1	77
3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>ntcA</i> DE <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	79
3.2.1. LOCALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>ntcA</i> EN LOS FILAMENTOS DE <i>Anabaena</i> DURANTE EL DESARROLLO DE LOS HETEROCISTOS	80
3.2.1.1. Preparación de la fusión traduccional del promotor silvestre de <i>ntcA</i> y el gen testigo <i>gfp</i>	81
3.2.1.2. Generación y caracterización de la estirpe CSEL4a, portadora de la fusión traduccional P <sub><i>ntcA</i></sub> - <i>gfp</i> integrada en el cromosoma	81
3.2.1.3. Análisis de la expresión del gen testigo <i>gfp</i> en la estirpe CSEL4a	84
3.2.2. ANÁLISIS DEL PAPEL DE LOS DISTINTOS ELEMENTOS DEL PROMOTOR DE <i>ntcA</i> EN LA EXPRESIÓN DE <i>ntcA</i> DURANTE EL DESARROLLO DE LOS HETEROCISTOS	86
3.2.2.1. Preparación de plásmidos y estirpes de <i>Anabaena</i>	86
A. Generación de distintas fusiones traduccionales portando versiones alteradas de la región promotora de <i>ntcA</i> y el gen testigo <i>gfp</i>	86
B. Generación y caracterización de estirpes portadoras de las fusiones traduccionales del gen <i>gfp</i> con versiones alteradas del promotor de <i>ntcA</i>	89
3.2.2.2. Deleciones seriadas de la región promotora de <i>ntcA</i>	91
A. Análisis de la expresión del gen <i>gfp</i>	92
Ensayo de extensión de cebador	92
Análisis de northern	92
B. Análisis de la expresión de la proteína GFP	94
3.2.2.3. Mutación de los sitios de unión de NtcA	96
A. Ensayos de unión de la proteína NtcA	98
Ensayos de retardo en gel	98

Ensayos de protección frente a la degradación por DNasa I	102
B. Análisis de la expresión del gen <i>gfp</i>	106
Ensayo de extensión de cebador	106
C. Análisis de la expresión de la proteína GFP	107
3.2.2.4. Análisis de la expresión desde el TSP -49 en ausencia de expresión desde el TSP -180	110
A. Análisis de la expresión del gen <i>gfp</i>	112
Ensayo de extensión de cebador	112
B. Análisis de la expresión de la proteína GFP	112
3.3. BÚSQUEDA DE POSIBLES ELEMENTOS REGULADORES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LOS HETEROCISTOS	115
3.3.1. ANÁLISIS DEL SUBPROTEOMA QUE PRESENTA AFINIDAD POR HEPARINA DE CÉLULAS DE <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 SOMETIDAS A DEFICIENCIA EN NITRÓGENO	115
3.3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ALGUNOS GENES SELECCIONADOS A PARTIR DEL ESTUDIO PROTEÓMICO	122
4. DISCUSIÓN	129
4.1. REGULACIÓN POR <i>NtcA</i> DEL DESARROLLO DE LOS HETEROCISTOS	131
4.2. LOS PROMOTORES DE <i>ntcA</i> EN <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	136
4.3. IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS PROTEÍNAS INDUCIDAS DURANTE EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE LOS HETEROCISTOS	144
5. CONCLUSIONES	149
6. BIBLIOGRAFÍA	153

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Diversidad morfológica y diferenciación celular en las cianobacterias	4
<b>Figura 1.2.</b> Relaciones filogenéticas entre las cianobacterias	5
<b>Figura 1.3.</b> Heterocistos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	11
<b>Figura 1.4.</b> Rutas metabólicas básicas del heterocisto, desde la degradación de azúcares hasta la producción de glutamina	15
<b>Figura 2.1.</b> Mutagénesis dirigida: método del “Megacebador”	42
<b>Figura 2.2.</b> Purificación de la proteína NtcA recombinante	53
<b>Figura 3.1.</b> Representación esquemática de la construcción de pCSM1	65
<b>Figura 3.2.</b> Análisis de la estructura genómica de la región <i>ntcA</i> en las estirpes CSEL1 y CSEL2	66
<b>Figura 3.3.</b> Expresión de <i>ntcA</i> en las estirpes CSEL1 y CSEL2	68
<b>Figura 3.4.</b> Cantidad de proteína NtcA en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y en las estirpes 216 ( <i>hetR</i> ), CSEL1 y CSEL2	69
<b>Figura 3.5.</b> Análisis del crecimiento de las estirpes CSEL1 y CSEL2 en medio sólido con distintas fuentes de nitrógeno	70
<b>Figura 3.6.</b> Desarrollo de heterocistos en la estirpe CSEL1	70
<b>Figura 3.7.</b> Expresión de los operones <i>cox2</i> , <i>devBCA</i> y <i>nifHDK</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y en las estirpes 216, CSEL1 y CSEL2	72
<b>Figura 3.8.</b> Escisión del fragmento de 11 kb que interrumpe el gen <i>nifD</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y en las estirpes 216, CSEL1 y CSEL2	75
<b>Figura 3.9.</b> Escisión del fragmento de 55 kb que interrumpe el gen <i>fdxN</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y en las estirpes 216, CSEL1 y CSEL2	76
<b>Figura 3.10.</b> Expresión de los operones <i>nir</i> y <i>rbcLXS</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y la estirpe CSEL1	77
<b>Figura 3.11.</b> Región promotora de <i>ntcA</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	80
<b>Figura 3.12.</b> Representación esquemática de la construcción de pCSEL22a	82
<b>Figura 3.13.</b> Análisis de la estructura de la región genómica de <i>ntcA</i> en la estirpe CSEL4a	83
<b>Figura 3.14.</b> Expresión espacial y temporal de la fusión $P_{ntcA}$ - <i>gfp</i> en la estirpe CSEL4a	85
<b>Figura 3.15.</b> Expresión de la fusión $P_{ntcA}$ - <i>gfp</i> en el heterocisto maduro en la estirpe CSEL4a	85
<b>Figura 3.16.</b> Representación esquemática de la construcción de los plásmidos que portan fusiones traduccionales del gen testigo <i>gfp</i> con versiones alteradas del promotor de <i>ntcA</i>	87
<b>Figura 3.17.</b> Representación esquemática de las regiones de <i>nucA</i> y <i>ntcA</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y de la región <i>nucA</i> en las estirpes portadoras de fusiones traduccionales $P_{ntcA}$ - <i>gfp</i>	90

<b>Figura 3.18.</b> Representación esquemática de las delecciones seriadas de la región promotora de <i>ntcA</i> fusionadas al gen testigo <i>gfp</i> (A) y análisis de la estructura genómica y segregación de las estirpes CSEL6, CSEL7, CSEL8 y CSEL9 (B)	91
<b>Figura 3.19.</b> Determinación de los sitios de inicio de la transcripción del gen <i>gfp</i> en las estirpes CSEL6, CSEL7, CSEL8 y CSEL9	93
<b>Figura 3.20.</b> Estudio de la expresión del gen <i>gfp</i> bajo la dirección del promotor silvestre de <i>ntcA</i> (estirpe CSEL6) o de versiones delecionadas del mismo (estirpes CSEL7, CSEL8 y CSEL9)	93
<b>Figura 3.21.</b> Fluorescencia de la proteína GFP en las estirpes CSEL6, CSEL7, CSEL8, CSEL9 y CSEL13	95
<b>Figura 3.22.</b> Representación esquemática de las versiones alteradas de la región promotora de <i>ntcA</i> (fusionadas al gen testigo <i>gfp</i> ) que portan mutaciones en los sitios de unión de NtcA (A) y análisis de la estructura genómica y segregación de las estirpes CSEL10, CSEL11 y CSEL12 (B)	97
<b>Figura 3.23.</b> Ensayos de retardo en gel de los fragmentos de $P_{ntcA}$ silvestre y conteniendo mutaciones en los sitios de unión de NtcA	99
<b>Figura 3.24.</b> Ensayos de retardo en gel de los fragmentos de $P_{ntcA}$ silvestre y conteniendo mutaciones en los sitios de unión de NtcA en presencia de un fragmento competidor no radiactivo específico ( $P_{glnA}$ ) o no específico ( $P_{psbA}$ )	100
<b>Figura 3.25.</b> Análisis del efecto del 2-OG en la unión de NtcA a los fragmentos de $P_{ntcA}$ silvestre y conteniendo mutaciones en los sitios de unión de NtcA	101
<b>Figura 3.26.</b> Análisis de protección por NtcA frente a la digestión por DNasa I de fragmentos derivados del promotor de <i>ntcA</i> marcados radiactivamente en la cadena codificante (superior)	103
<b>Figura 3.27.</b> Análisis de protección por NtcA frente a la digestión por DNasa I de fragmentos derivados del promotor de <i>ntcA</i> marcados radiactivamente en la cadena no codificante (inferior)	104
<b>Figura 3.28.</b> Interpretación de los resultados obtenidos en el análisis de protección por NtcA frente a la digestión por DNasa I de fragmentos derivados del promotor de <i>ntcA</i>	105
<b>Figura 3.29.</b> Determinación de los sitios de inicio de la transcripción del gen <i>gfp</i> en las estirpes CSEL10, CSEL11 y CSEL12	107
<b>Figura 3.30.</b> Fluorescencia de la proteína GFP en las estirpes CSEL10, CSEL11 y CSEL12	108
<b>Figura 3.31.</b> Representación esquemática de la fusión traduccional del gen testigo <i>gfp</i> con versiones del promotor de <i>ntcA</i> carentes de $P_3$ y que portan mutaciones en los sitios de unión de NtcA (A) y análisis de la estructura genómica y segregación de las estirpes mutantes CSEL14, CSEL15, CSEL16 y CSEL17 (B)	111
<b>Figura 3.32.</b> Determinación de los sitios de inicio de la transcripción del gen <i>gfp</i> en las estirpes CSEL14, CSEL15, CSEL16 y CSEL17	113
<b>Figura 3.33.</b> Fluorescencia de la proteína GFP en las estirpes CSEL14, CSEL15, CSEL16 y CSEL17	114

<b>Figura 3.34.</b> Electroforesis bidimensional de las proteínas con afinidad por heparina de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	116
<b>Figura 3.35.</b> Estudio de la expresión de los genes de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 determinados en el estudio proteómico	124
<b>Figura 4.1.</b> Modelo de activación de la expresión de genes específicos del desarrollo de los heterocistos dependientes de NtcA y de HetR	135
<b>Figura 4.2.</b> Modelo de activación de la región promotora de <i>ntcA</i> en las células vegetativas y en células en proceso de desarrollo en respuesta a la deficiencia de nitrógeno	142
<b>Figura 4.3.</b> Análisis comparativo de la secuencia de nucleótidos de la región promotora de <i>ntcA</i> de las estirpes cianobacterianas filamentosas formadoras de heterocistos <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413, <i>Nostoc punctiforme</i> y <i>Nodularia spumigena</i>	143

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Genes implicados en el desarrollo y funcionamiento de los heterocistos	18
<b>Tabla 1.2.</b> Algunos promotores dependientes de NtcA utilizados durante el desarrollo de los heterocistos o en el heterocisto maduro	24
<b>Tabla 2.1.</b> Estirpes mutantes derivadas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 utilizadas en este trabajo y no generadas en el mismo	29
<b>Tabla 2.2.</b> Estirpes mutantes derivadas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 utilizadas en este trabajo y generadas en el mismo	29
<b>Tabla 2.3.</b> Estirpes de <i>E.coli</i> utilizadas en este trabajo	32
<b>Tabla 2.4.</b> Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo	33
<b>Tabla 2.5.</b> Plásmidos utilizados construidos en este trabajo	35
<b>Tabla 2.6.</b> Descripción de las DNA polimerasas utilizadas en este trabajo	39
<b>Tabla 2.7a.</b> Desoxioligonucleótidos utilizados en los apartados 3.1 y 3.2 de Resultados	39
<b>Tabla 2.7b.</b> Desoxioligonucleótidos utilizados en el apartado 3.3 de Resultados	41
<b>Tabla 3.1.</b> Plásmidos construidos para la generación de fusiones traduccionales del gen testigo <i>gfp</i> con <i>ntcA</i> y distintas versiones de $P_{ntcA}$ , para su integración en la plataforma <i>nuc</i>	88
<b>Tabla 3.2.</b> Proteínas con afinidad por heparina correspondientes a filamentos cultivados con amonio e incubados 3 h en deficiencia de nitrógeno combinado identificadas mediante espectrometría de masas	119
<b>Tabla 3.3.</b> Proteínas con afinidad por heparina correspondientes a filamentos cultivados con amonio e incubados 6 h en deficiencia de nitrógeno combinado identificadas mediante espectrometría de masas	120
<b>Tabla 3.4.</b> Proteínas con afinidad por heparina correspondientes a filamentos cultivados con amonio e incubados 9 h en deficiencia de nitrógeno combinado identificadas mediante espectrometría de masas	120
<b>Tabla 3.5.</b> Proteínas con afinidad por heparina correspondientes a filamentos cultivados con amonio e incubados 24 h en deficiencia de nitrógeno combinado identificadas mediante espectrometría de masas	121
<b>Tabla 3.6.</b> ORFs seleccionadas para el análisis mediante northern	123
<b>Tabla 4.1.</b> Genes inducibles en deficiencia de nitrógeno cuya expresión es indetectable o muy baja en amonio	145
<b>Tabla 4.2.</b> Genes inducibles en deficiencia de nitrógeno con expresión apreciable en amonio	147

## ABREVIATURAS

A	Absorbancia
ADP	Adenosina difosfato
Ap	Ampicilina
APS	Persulfato amónico
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
ATP	Adenosina trifosfato
b	Nucleótido (base)
Bm	Bleomicina
BSA	Seroalbúmina bovina
Ci	Curios
Chl	Clorofila <i>a</i>
C/N	Relación Carbono/Nitrógeno
Cm	Cloramfenicol
Con	Constitutiva (expresión génica)
CRP	cAMP receptor protein (proteína receptora de AMP cíclico)
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	Trifosfato de desoxicitidina
ddNTP	Didesoxirribonucleósidos trifosfato
DEPC	Dietil pirocarbonato
dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Mezcla de los 4 desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
E	Einstein (mol de fotones)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Etidio	3, 8-diamino-6-etil-5-fenilfenantridio
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (cromatografía líquida)
G6P	Glucosa-6-fosfato
GFP	Green Fluorescent Protein (proteína verde fluorescente)
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry (espectrometría de masas)



Mb	Millones de pares de bases
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NaI	Resistencia a ácido nalidíxico
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido
Nm	Neomicina
2-OG	2-oxoglutarato
ORF	Open Reading Frame (pauta abierta de lectura)
P <sub>x</sub>	Promotor de gen "x"
p/p	Relación peso / peso
p/v	Relación peso / volumen
pb	Par de nucleótidos (bases)
PCC	Pasteur Culture Collection (Colección de Cultivos Tipo del Instituto Pasteur)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
6PG	6-Fosfogluconato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
SDS	Laurilsulfato sódico
Sm	Estreptomina
Sp	Espectinomicina
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metiletilendiamina
TES	Ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
Tricina	N-tris(hidroximetil)metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
TSP	Transcription start point (sitios de inicio de la transcripción)
U	Unidad de actividad enzimática
v/v	Relación volumen / volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

## *Índice*

### Bases nitrogenadas

A	adenina
C	citosa
G	guanina
T	timina

### Aminoácidos

A	Ala	alanina	L	Leu	leucina
R	Arg	arginina	K	Lys	lisina
N	Asn	asparragina	M	Met	metionina
D	Asp	ácido aspártico	F	Phe	fenilalanina
C	Cys	cisteína	P	Pro	prolina
E	Glu	ácido glutámico	S	Ser	serina
Q	Gln	glutamina	T	Thr	treonina
G	Gly	glicina	W	Trp	triptófano
H	His	histidina	Y	Tyr	tirosina
I	Ile	isoleucina	V	Val	valina

## 1. INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. LAS CIANOBACTERIAS

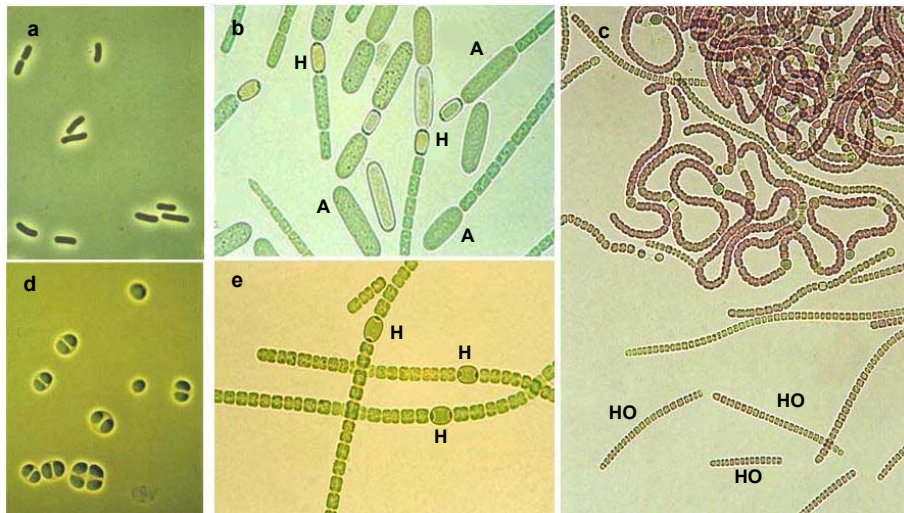
Las cianobacterias son bacterias con una estructura celular Gram-negativa (Stanier y Cohen-Bazire, 1977) que constituyen un grupo bien definido dentro de las eubacterias (Woese, 1987). Se caracterizan por llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica, capaz de oxidar el agua y de producir O<sub>2</sub> molecular, siendo su aparato fotosintético muy similar en funcionamiento y estructura al de los cloroplastos de las algas y plantas superiores (DeRuyter y Fromme, 2008).

Se ha postulado que las cianobacterias tuvieron un papel muy importante en el desarrollo de la vida en la Tierra, ya que se considera que fueron los primeros organismos capaces de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica, contribuyendo al desarrollo de la atmósfera actual (Buick, 1992). Actualmente, el papel que juegan en los ciclos del carbono y el nitrógeno hace que las cianobacterias constituyan un grupo de organismos muy importante en el mantenimiento de la Biosfera. Los primeros fósiles atribuidos a cianobacterias fueron encontrados en rocas sedimentarias generadas hace 3.500 millones de años (Schopf y Walter, 1982; Schopf y Packer, 1987), pero en la actualidad se cree que la aparición de los primeros organismos capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica tuvo lugar hace unos 2.800 millones de años (Knoll, 2008).

Las cianobacterias están presentes en una gran variedad de nichos ecológicos, desde océanos, suelos y aguas continentales hasta ambientes extremos como las regiones árticas, aguas termales y desiertos. Asimismo, algunas estirpes establecen simbiosis con hongos, plantas, esponjas o protistas (Adams, 2000). Esta gran capacidad de adaptación podría deberse al desarrollo de sistemas de regulación específicos, complementarios a otros generales encontrados en otras bacterias (Tandeau de Marsac y Houmard, 1993).

Entre las bacterias, las cianobacterias presentan una amplia diversidad morfológica (Fig. 1.1), por lo que no es sorprendente que las clasificaciones taxonómicas tradicionales se basaran en criterios morfológicos y de división celular, distinguiéndose cinco grupos (Rippka *et al.*, 1979). La Sección I (Chroococcales) comprende las cianobacterias unicelulares que se dividen por fisión binaria o gemación. La Sección II (Pleurocapsales) la constituyen cianobacterias unicelulares capaces de dividirse por fisión múltiple o por fisión múltiple y binaria. En la Sección III (Oscillatoriales) se agrupan las estirpes filamentosas no formadoras de heterocistos, mientras que en la Sección IV (Nostocales) están las cianobacterias filamentosas que se dividen en un solo plano y presentan capacidad de diferenciar heterocistos a partir de células vegetativas. La Sección V está constituida por estirpes filamentosas formadoras de heterocistos cuyas células se dividen en varios planos, dando lugar a una organización multicelular más compleja (Stigonematales).

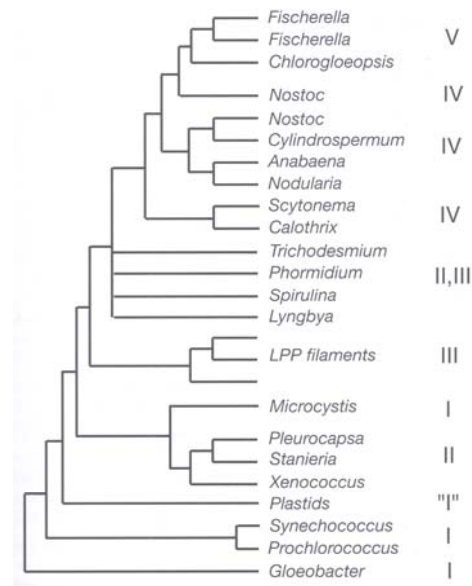
Hay que destacar la capacidad de diferenciación celular de las cianobacterias. Algunas estirpes de cianobacterias filamentosas son capaces de desarrollar células especializadas en la fijación del nitrógeno atmosférico (heterocistos) y/o células de resistencia (akinetos), y algunas cianobacterias filamentosas formadoras o no de heterocistos pueden diferenciar hormogonios, pequeños filamentos móviles distinguibles del filamento vegetativo, que están implicados en la dispersión de la especie en sus hábitats naturales (Fig. 1.1) (Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Wolk, 1980).



**Figura 1.1. Diversidad morfológica y diferenciación celular en las cianobacterias.** a) *Synechococcus* sp. PCC 9321 (cortesía de A.M. Muro-Pastor); b) filamentos de *Anabaena cylindrica* ATCC 29414; c) *Nostoc* sp. PCC 9203; d) estirpe PCC 9317 (género sin asignar) (cortesía de A.M. Muro-Pastor); e) estirpe 9v, aislada en Mkinda (Tanzania). En las fotos se señalan los hormogonios (HO), akinetos (A) y heterocistos (H). (Las fotos b, c y e han sido tomadas de Herrero *et al.*, 2004).

Las filogenias cianobacterianas basadas en análisis moleculares (Giovanonni *et al.*, 1988; Turner *et al.*, 1999; Sánchez-Baracaldo *et al.*, 2005; Tomitani *et al.*, 2006) apoyan sólo en parte la clasificación de Rippka *et al.* (1979). Sólo aquellos grupos que comparten características como la fisión múltiple (Sección II) o la diferenciación celular (Secciones IV y V conjuntamente) son filogenéticamente coherentes. La Figura 1.2, tomada de Knoll (2008), ilustra las relaciones filogenéticas entre las cianobacterias, establecidas a partir de análisis moleculares. Se ha especulado que el ancestro común de las cianobacterias fue unicelular y fotoautótrofo, que vivió en ambientes terrestres o de agua dulce y que no tenía la capacidad de fijar nitrógeno (Sánchez-Baracaldo *et al.*, 2005). Los diferentes estudios filogenéticos indican que las estirpes filamentosas aparecieron relativamente tarde en la historia evolutiva de las cianobacterias, tras lo cual se desarrolló la capacidad de diferenciación celular.

Las cianobacterias exhiben un amplio rango de contenido G+C (32-71%), cercano al rango de valores encontrado en procariotas. Su genoma puede exceder el tamaño del de cualquier otro grupo bacteriano (2-13 Mb) (Herdman *et al.*, 1979a; 1979b). Entre las cianobacterias cuyo genoma ha sido secuenciado el rango es de 1,66 Mb (*Prochlorococcus marinus* MED4) a aproximadamente 9,8 Mb (*Nostoc punctiforme* ATCC 29133).



**Figura 1.2. Relaciones filogenéticas entre las cianobacterias.** El árbol que se muestra está tomado de Knoll (2008) y está basado en la comparación de secuencias moleculares, particularmente en las descritas por Sánchez-Baracaldo *et al.* (2005) y Tomitani *et al.* (2006). Los números romanos hacen referencia a la clasificación taxonómica de Rippka *et al.* (1979).

Las analogías de estructura y funcionamiento, además de la comparación de secuencias del rRNA 16S y de algunos genes ligados o relacionados con la fotosíntesis, han permitido establecer una relación filogenética entre los cloroplastos y las cianobacterias, así como entre éstas y el orgánulo fotosintético de *Cyanophora paradoxa* (Giovanonni *et al.*, 1988; 1992; Löffelhardt y Bohnert, 1994), reforzando la teoría endosimbiótica del origen de los cloroplastos (Gray, 1989). Cianobacterias de vida intracelular obligatoria, como la presente en la ameba *Paulinella chromatophora*, podrían representar asimismo nuevos orgánulos en evolución (Bodyl *et al.*, 2007).

En cuanto a sus características metabólicas las cianobacterias constituyen un grupo muy homogéneo. Todas las cianobacterias que se conocen son capaces de vivir en condiciones fotoautotróficas, para lo cual sólo se requieren unos pocos nutrientes, y sólo algunas pueden crecer en condiciones fotoheterotróficas o heterotróficas en presencia de determinados azúcares como sacarosa, glucosa o fructosa. Todas pueden llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica y sólo algunas, como *Oscillatoria limnetica*, en determinadas condiciones, una fotosíntesis anoxigénica oxidando  $H_2S$  y liberando S. La fijación de carbono tiene lugar por el ciclo reductivo de las pentosas fosfato

(ciclo de Calvin). Parte del CO<sub>2</sub> fijado se acumula en forma de glucógeno como material de reserva que se utiliza en los períodos de oscuridad, cuando no tiene lugar la fotosíntesis. El glucógeno y los azúcares se metabolizan mediante el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato. Estos organismos presentan un ciclo de Krebs incompleto por la falta de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa, por lo que es un ciclo con un papel anabólico más que catabólico al proporcionar el esqueleto carbonado para la asimilación de nitrógeno, el 2-oxoglutarato (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). En la oscuridad, las cianobacterias muestran un metabolismo respiratorio que está sujeto a una estricta regulación por luz, y la cadena de transporte respiratoria comparte parte de sus componentes con la cadena de transporte de electrones fotosintética (Schmetterer, 1994).

En el aparato fotosintético cianobacteriano, una fracción importante de la captación de la luz tiene lugar en los ficobilisomas, estructuras supramoleculares constituidas por pigmentos antena (ficobiliproteínas) que interaccionan con la membrana tilacoidal. A diferencia de las plantas, las cianobacterias carecen de clorofila *b* (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Las ficobiliproteínas, que transfieren la energía principalmente al fotosistema II, constituyen hasta el 50% de la proteína total celular, pudiendo servir de reserva de nitrógeno y carbono (Allen, 1984).

La estirpe en la que se ha centrado este trabajo es la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120, perteneciente a la sección IV de la clasificación de Rippka *et al.* (1979).

## 1.2. LOS HETEROCISTOS

La reducción de dinitrógeno a amonio durante la fijación biológica del nitrógeno está catalizada por el complejo enzimático de la nitrogenasa, el cual es extremadamente sensible al oxígeno. La nitrogenasa se desactiva de forma rápida e irreversible cuando se extrae de las células en presencia de oxígeno (Robson y Postgate, 1980). Las cianobacterias han desarrollado distintos mecanismos o estrategias para proteger la maquinaria de fijación de nitrógeno no sólo frente al oxígeno atmosférico sino también al que se genera intracelularmente como resultado de la fotosíntesis oxigénica. Estos mecanismos van desde llevar a cabo la fijación únicamente en condiciones anóxicas hasta la separación temporal o incluso espacial de la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis oxigénica (Fay, 1992; Flores y Herrero, 1994). La estrategia más común en las cianobacterias no formadoras de heterocistos es la separación temporal de los dos procesos (Huang *et al.*, 1999; Reade *et al.*, 1999; Misra y Tuli, 2000). En el caso de algunas cianobacterias filamentosas, como *Anabaena*, se lleva a cabo la separación espacial de estos dos sistemas metabólicos incompatibles mediante el desarrollo, a partir de células vegetativas, de células



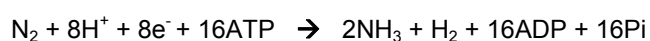
terminalmente diferenciadas denominadas heterocistos. Los heterocistos son células especializadas en la fijación de nitrógeno que presentan una estructura y fisiología específicas para la creación y el mantenimiento de un ambiente microaeróbico óptimo para el funcionamiento de la nitrogenasa (Figuras 1.1 y 1.3). Hay fósiles que sugieren que los heterocistos representan una solución ancestral al cambio que supuso el desarrollo de una atmósfera óxica como producto de la fotosíntesis cianobacteriana (Tomitani *et al.*, 2006).

Los heterocistos se diferencian en respuesta a la deficiencia de nitrógeno combinado en el medio (Fogg, 1949), aunque existen indicaciones de que cambios en la luz o la temperatura también pueden estimular su formación (Wolk, 2000). En la mayoría de las cianobacterias formadoras de heterocistos se establece un patrón de desarrollo unidimensional en el que los heterocistos se disponen de forma regular, cada 10-15 células vegetativas, a lo largo del filamento, dando lugar a un organismo multicelular compuesto por dos tipos celulares interdependientes (Figuras 1.1 y 1.3). Este patrón se mantiene durante el crecimiento diazotrófico (a expensas del nitrógeno atmosférico) mediante la formación de heterocistos aproximadamente en un punto equidistante entre dos heterocistos ya existentes.

La posición filogenética de las cianobacterias, la supuesta antigüedad del proceso de diferenciación de heterocistos y las interacciones célula-célula durante el crecimiento diazotrófico hacen de este sistema un modelo de estudio (Golden y Yoon, 1998). Parece ser que los heterocistos no fueron las primeras células diferenciadas que aparecieron en la Tierra. Se podría especular que *Clostridium* sp. ya presentaba la capacidad de esporular, y quizá las cianobacterias habían desarrollado con anterioridad la habilidad de formar akinetos. Sin embargo, una diferencia importante es que mientras que el papel de las esporas, akinetos y otras células latentes es el de mantener la supervivencia de células individuales hasta que se den unas condiciones de temperatura y nutrición adecuadas en el medio, el de los heterocistos consiste en proporcionar de forma inmediata un nutriente necesario a las células del filamento (Wolk *et al.*, 1994).

### 1.2.1. FIJACIÓN DE NITRÓGENO

La fijación biológica del nitrógeno consiste en la reducción de una molécula de dinitrógeno ( $N_2$ ) a dos moléculas de amoníaco ( $NH_3$ ):



Esta reacción es muy endergónica y se requieren un mínimo de 16 moles de ATP por mol de  $N_2$  reducido. El complejo enzimático que cataliza la reacción, la nitrogenasa, está formado por dos componentes proteicos: la dinitrogenasa (proteína que contiene Fe y Mo) y la dinitrogenasa reductasa (proteína que contiene Fe). La dinitrogenasa es un heterotetrámero compuesto por dos

subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  determinadas por los genes *nifD* y *nifK* respectivamente, y tiene un peso molecular de unos 220-240 kDa; contiene cuatro centros [4Fe-4S] organizados como dos “agrupamientos P” (Dean *et al.*, 1993) y dos cofactores Fe-Mo. La dinitrogenasa reductasa es un dímero compuesto por dos subunidades idénticas, determinadas por el gen *nifH*, con una masa molecular aproximada de 60-70 kDa y un centro [4Fe-4S]. La dinitrogenasa reductasa media la transferencia, dependiente de ATP, de electrones procedentes de donadores externos como la ferredoxina o la flavodoxina a los “agrupamientos P” de la dinitrogenasa, la cual une  $N_2$  mediante el cofactor Fe-Mo y cataliza la reducción del  $N_2$  a  $NH_3$ .

La fijación de nitrógeno va acompañada de la reducción de protones ( $H^+$ ) y formación de  $H_2$  (Fay 1992). La producción de  $H_2$  catalizada por la nitrogenasa supone un gasto de energía y poder reductor para la célula que disminuye la eficiencia del proceso de fijación de  $N_2$ . Éstos se recuperan de forma parcial por la acción de la hidrogenasa. La hidrogenasa de consumo irreversible, determinada por los genes *hupL* y *hupS* (Tamagnini *et al.*, 2002), cataliza una reacción ( $H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$ ) mediante la cual devuelve electrones a las cadenas de transporte de electrones respiratoria y fotosintética generando ATP y poder reductor. También colabora en el mantenimiento de los niveles microóxicos del heterocisto mediante la reducción de oxígeno ( $2H_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O$ ) (Houchins, 1984).

*Anabaena* sp. PCC 7120 y *Anabaena variabilis* poseen una ferredoxina [2Fe-2S] específica de los heterocistos (FdxH) que, a diferencia de la ferredoxina de las células vegetativas (PetF), media de forma eficiente el transporte de electrones a la nitrogenasa *in vitro*, por lo que se la considera el donador fisiológico de electrones para la nitrogenasa cuando no hay deficiencia de hierro (Schrautemeier y Böhme, 1985). La ferredoxina es reducida en última instancia por donadores de electrones orgánicos (Wolk *et al.*, 1994; ver siguiente apartado). La diferencia entre las dos ferredoxinas parece residir en un grupo de residuos cargados positivamente característicos de FdxH que favorecen la interacción con la dinitrogenasa reductasa (Schmitz *et al.*, 1993). Se ha determinado que la expresión de *fdxH* tiene lugar en la fase tardía del proceso de diferenciación y que coincide con la aparición de la actividad nitrogenasa (Böhme y Haselkorn, 1988). La mutación de *fdxH* confirmó que FdxH es necesaria para el crecimiento óptimo en condiciones de deficiencia de nitrógeno pero indicó que deben existir otros donadores alternativos (Masepohl *et al.*, 1997a). Se ha descrito la existencia de una piruvato-flavodoxina oxidoreductasa que es esencial para la fijación de nitrógeno en condiciones de deficiencia de hierro (Bauer *et al.*, 1993), por lo que, en estas condiciones, la flavodoxina podría actuar como donador de electrones (Leonhardt y Straus, 1989). Sin embargo, experimentos *in vitro* han mostrado que la flavodoxina es un pobre donador de electrones a la nitrogenasa de *Anabaena* (Masepohl *et al.*, 1997a; Razquin *et al.*, 1994).

Por razones que se desconocen, los operones *nif* de las células vegetativas de *Anabaena* sp. PCC 7120 están interrumpidos por dos elementos de DNA que se escinden, por recombinación específica de sitio, en una fase tardía durante el proceso de diferenciación en las células en

desarrollo (Golden *et al.*, 1985, 1988a). La eliminación de estos elementos del cromosoma de *Anabaena* es necesaria para que tenga lugar la transcripción completa de los operones *nifHDK* (Haselkorn *et al.*, 1983) y *nifB-fdxN-nifS-nifU* (Mulligan y Haselkorn, 1989). En el elemento de 11 kb que se encuentra dentro del gen *nifD* está codificada una recombinasa específica de sitio, XisA, que cataliza la escisión del fragmento de DNA entre dos repeticiones de 11 pb que se localizan en los extremos del inserto (Lammers *et al.*, 1986). La inactivación de *xisA* no afecta a la transcripción de *nifHD*, pero al eliminar la escisión del elemento, la transcripción no alcanza al gen *nifK*, por lo que la estirpe es incapaz de crecer en N<sub>2</sub> (Golden y Wiest, 1988). Por otra parte, la delección del promotor de *nifHDK* no afecta al proceso de reordenación (Golden *et al.*, 1991). El segundo elemento, de 55 kb, está situado en el gen *fdxN* que determina una ferredoxina de función desconocida (Mulligan *et al.*, 1988). La escisión de este elemento tiene lugar por recombinación específica de sitio entre dos secuencias repetidas de 5 pb, mediada por XisF (Carrasco *et al.*, 1994; Golden *et al.*, 1987; Golden *et al.*, 1992). La mutación de *xisF* produce un fenotipo Fix<sup>-</sup> (no hay fijación de nitrógeno en condiciones anaeróbicas) (Carrasco *et al.*, 1994). Se han descrito otros dos genes, *xisH* y *xisI*, situados próximos a *xisF*, implicados en la especificidad celular de la reordenación de *fdxN* (Ramaswamy *et al.*, 1997).

Estos elementos no están presentes en todas las cianobacterias formadoras de heterocistos (Wolk *et al.*, 1994). De hecho, la eliminación experimental del elemento de 11 kb del genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 no afecta al proceso de desarrollo de los heterocistos ni al crecimiento en ausencia de nitrógeno combinado (Brusca *et al.*, 1990). A pesar de no ser un elemento esencial (probablemente el de 55 kb tampoco), tiene un cierto papel regulador en el sentido de que su escisión es necesaria para la transcripción de los genes que determinan la nitrogenasa.

Durante el proceso de diferenciación tiene lugar asimismo la escisión de un tercer elemento, de 10,5 kb, que está localizado en el gen *hupL* (que determina la subunidad grande de la hidrogenasa de consumo irreversible) del cromosoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Matveyev *et al.*, 1994).

## 1.2.2. MORFOLOGÍA Y METABOLISMO

El proceso de diferenciación de los heterocistos implica un profundo cambio en la morfología y la bioquímica de la célula vegetativa encaminado a minimizar la concentración de oxígeno intracelular y a incrementar la eficiencia del proceso de fijación. Estos cambios incluyen la movilización de productos de reserva, la deposición de una envuelta multicapa externa a la pared celular, la formación de una unión estrecha entre el heterocisto y las células adyacentes, la reordenación del sistema de membranas intracitoplasmático, el incremento de la actividad respiratoria y la eliminación de la fotosíntesis oxigénica (Fay, 1992).

Cuando las células detectan la deficiencia de nitrógeno como consecuencia de la ausencia de nitrógeno combinado en el medio, condición que dispara el proceso de diferenciación, responden activando la degradación de proteínas (Fleming y Haselkorn, 1974) por la acción de enzimas proteolíticas (Wood y Haselkorn, 1976). Esta respuesta supone la movilización en todas las células vegetativas de productos nitrogenados de almacenamiento como son los gránulos de cianoficina (Simon, 1987) y las ficobiliproteínas (Glazer, 1987). Mientras que las ficobiliproteínas son, como se ha discutido anteriormente, pigmentos fotosintéticos, la cianoficina (multi-L-arginil-poli-L-aspartato) es un polímero de almacenamiento sintetizado no ribosómicamente. La cianoficina se acumula en forma de gránulos en el citoplasma de la célula principalmente en condiciones de crecimiento desfavorables (en la fase estacionaria o en condiciones de carencia de algún compuesto que no sea el nitrógeno) (Simon, 1987). El proceso de degradación de proteínas y cianoficina va asociado a la síntesis de nuevas proteínas, lo que resulta en la reorganización de la maquinaria bioquímica de la célula en desarrollo.

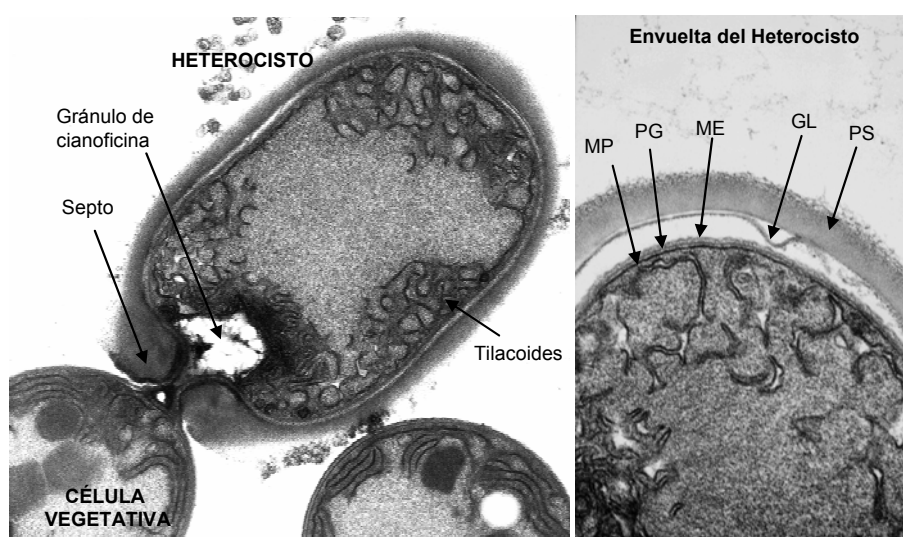
### 1.2.2.1. Adaptaciones estructurales

La disminución de la tasa de entrada de oxígeno atmosférico requiere una barrera hidrofóbica bien empaquetada (Walsby, 1985). Durante el desarrollo de los heterocistos se forma una gruesa envuelta multicapa externa a la pared celular de la célula Gram-negativa que reduce la difusión de gases al interior celular (Fig. 1.3). La capa laminada (más interna) está compuesta por glicolípidos específicos del heterocisto, que consisten en derivados de hexosas con largas cadenas de polialcoholes (Bryce *et al.*, 1972). La capa externa, homogénea, y probablemente también la más externa fibrosa están compuestas por polisacáridos específicos y probablemente constituyen una barrera de protección de la capa de glicolípidos frente a daños físicos (Cardemil y Wolk, 1979; Murry y Wolk, 1989). Se ha visto que en algunas especies cianobacterianas la composición de polisacáridos de la envuelta del heterocisto coincide con la de los akinetos (Wolk, 1996).

Se ha demostrado que la envuelta del heterocisto, especialmente la capa de glicolípidos, varía su grosor en función de la concentración del oxígeno extracelular (Kangatharalingam *et al.*, 1992). La existencia de ciertos mutantes que están afectados en la formación de la envuelta y que son incapaces de completar la maduración del protoplasto del heterocisto sugiere que el establecimiento de la barrera al oxígeno podría constituir un punto clave del desarrollo que podría disparar el proceso de maduración (Fiedler *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001). La envuelta del heterocisto debe proporcionar el grado de permeabilidad óptimo para asegurar que la concentración de N<sub>2</sub> sea suficientemente alta para saturar la nitrogenasa, y la del O<sub>2</sub> suficientemente baja para que pueda ser reducido a niveles intracelulares mínimos por la actividad respiratoria. Alternativamente, la pared del

heterocisto podría ser muy impermeable y el oxígeno y el nitrógeno molecular podrían entrar en el heterocisto por los septos desde las células vegetativas adyacentes (Walsby, 2007).

Durante el proceso de diferenciación tiene lugar un cambio en la distribución y naturaleza de las membranas intracitoplasmáticas. La distribución concéntrica y periférica de las membranas tilacoidales en las células vegetativas desaparece, formándose un nuevo sistema de membranas en el citoplasma del heterocisto más reticulado que se localiza próximo al septo (Wildon y Mercer, 1963; Lang, 1965; Lang y Fay, 1971; en Fay, 1992), constituyendo la región denominada “honeycomb” (en panal) (Lang y Fay, 1971). En esta zona se observa una alta concentración de enzimas respiratorias (Murry *et al.*, 1981). Aunque inicialmente se pensó que la membrana plasmática permanecía invariable, después se observaron diferencias en el tamaño y en el número de partículas presentes en la misma (Giddings y Staehelin, 1978). Los heterocistos presentan dos gránulos polares localizados próximos a los septos de unión con las células vegetativas que corresponden a gránulos de cianoficina (Sherman *et al.*, 2000).



**Figura 1.3. Heterocistos de *Anabaena* sp. PCC 7120.** Se muestra una fotografía al microscopio electrónico de un heterocisto terminal de *Anabaena* sp. PCC 7120 (izquierda) donde se observan la zona de unión entre el heterocisto y la célula vegetativa (septo), la zona del gránulo polar de cianoficina perdido durante la preparación de la muestra y las membranas intracitoplasmáticas (tilacoides) (foto tomada de Valladares *et al.*, 2007). La fotografía de la derecha corresponde a un detalle de la envuelta del heterocisto donde se indica la localización de las membranas externa (ME) e interna (MP), la capa de peptidoglicano (PG), la capa laminada de glicolípidos (GL) y la capa homogénea de polisacáridos (PS) (foto tomada de Flores *et al.*, 2006). El amplio espacio entre la ME y la PS, en la que se encuentra la GL, es un artefacto consecuencia del proceso de deshidratación en la preparación de la muestra.

### 1.2.2.2. Adaptaciones metabólicas

Las condiciones microóxicas del heterocisto se deben en parte al elevado metabolismo respiratorio (Fay, 1992). El metabolismo respiratorio en los heterocistos tendría dos funciones

principales, la de mantener un ambiente microaeróbico en el entorno de la enzima nitrogenasa y, al menos en la oscuridad, la de proporcionar ATP para la reducción de  $N_2$ . Los heterocistos tienen una gran capacidad respiratoria de forma que, aunque representan una minoría respecto a las células vegetativas en el filamento, igualan o incluso superan la tasa respiratoria de éstas (Murry y Wolk, 1989). En *Anabaena* sp. PCC 7120 se han descrito tres agrupaciones de genes *cox* que determinan oxidasas respiratorias “terminales” de tipo hemo-cobre (Jones y Haselkorn, 2002; Valladares *et al.*, 2003). El operón *cox1* se expresa en las células vegetativas independientemente de la fuente de nitrógeno (Jones y Haselkorn, 2002; Valladares *et al.*, 2003). Sin embargo, los operones *cox2* y *cox3* se expresan, en respuesta a la deficiencia de nitrógeno combinado en el medio, de forma específica en los proheterocistos y heterocistos maduros (Valladares *et al.*, 2003). Valladares *et al.* (2007) han determinado, mediante el análisis de mutantes simples y dobles de *cox2* y *cox3*, que ambas oxidasas contribuyen de forma diferente a la protección de la nitrogenasa frente al oxígeno. Mientras que Cox3 parece ejercer el papel principal, Cox2 proporciona cierta protección en ausencia de Cox3. Esta diferencia podría estar relacionada con la naturaleza de las oxidasas y su posible afinidad diferencial por el oxígeno (Cox2 es una citocromo *c* oxidasa, mientras que Cox3 podría ser una quinol oxidasa). La falta de Cox2 y Cox3 en un doble mutante resulta en la ausencia de la membrana tipo “honeycomb” específica de los heterocistos, en la ausencia de actividad nitrogenasa en condiciones aeróbicas y por lo tanto en la incapacidad de crecer diazotróficamente, así como en la acumulación de glucógeno. Por otra parte, en condiciones de crecimiento aeróbicas, los mutantes *cox* presentan una expresión normal de los operones *nifHDK* y *hesAB-fdxH*, lo que sugiere que no se requiere un ambiente microaeróbico para la expresión génica durante el desarrollo (Valladares *et al.*, 2007). Esto difiere de lo observado en otros organismos fijadores de nitrógeno en los que la expresión de los genes *nif* responde a los niveles de oxígeno (Martínez-Argudo *et al.*, 2005). Quizá el desarrollo de los heterocistos para albergar a la maquinaria de fijación en condiciones óxicas haya eliminado la necesidad de un control directo de la expresión de los genes *nif* por el oxígeno.

Durante el desarrollo de los heterocistos se reorganiza el aparato fotosintético de forma que no existe actividad del fotosistema II ni la consecuente producción de  $O_2$  en los mismos (Bradley y Carr, 1971; Donze *et al.*, 1972). Se ha demostrado que los heterocistos poseen una cantidad significativamente reducida de pigmentos fotosintéticos respecto a las células vegetativas. Ello es debido a que en el heterocisto maduro no hay síntesis *de novo* de ficobiliproteínas, sino que los pigmentos fotosintéticos proceden de las células vegetativas a partir de las cuales se han desarrollado (Yamanaka y Glazer, 1983). Las ficobiliproteínas en los heterocistos permanecen activas constituyendo el complejo antena que provee de energía al fotosistema I. Además, existe una reducción en la concentración de clorofila *a* y posiblemente de los complejos proteína-clorofila (Alberte *et al.*, 1980), así como del citocromo *b-559* (Almon y Böhme, 1980). En el heterocisto maduro se mantiene la fotofosforilación cíclica asociada al fotosistema I generándose ATP. No obstante, a través

del fotosistema I también puede darse un flujo no cíclico de electrones transferidos desde  $H_2$  (generado por la nitrogenasa), NADH o NADPH a través de hidrogenasas y deshidrogenasas.

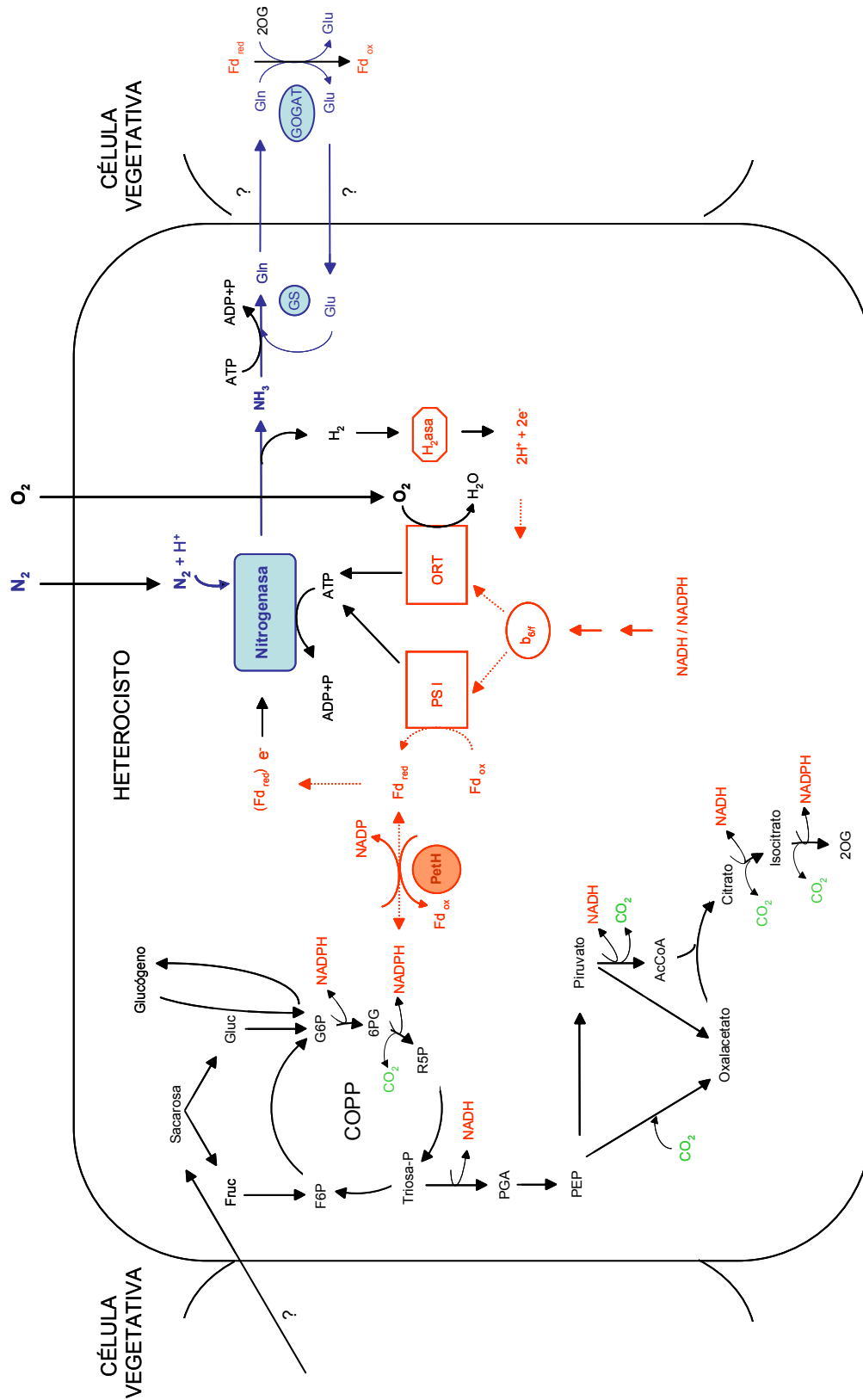
Durante el proceso de diferenciación, los heterocistos pierden la capacidad de fijar fotosintéticamente  $CO_2$ , de forma que el poder reductor y la energía que se genera en la célula se dirige a la reducción de  $N_2$ . Esto se debe a que carecen de la enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) (Stewart y Codd, 1975; Winklenbach y Wolk, 1973), que es clave en el ciclo de Calvin, así como de fosforribuloquinasa. Unos estudios realizados con la proteína testigo LuxAB mostraron que en el heterocisto no hay expresión del operón *rbcLXS* que determina la Rubisco (Elhai y Wolk, 1990). Estos cambios en el metabolismo de la célula limitan a los heterocistos a un metabolismo fotoheterotrófico dependiente de las células vegetativas, que les suministran los compuestos que proporcionan el poder reductor para la fijación de nitrógeno y los esqueletos carbonados para la asimilación del nitrógeno fijado (Wolk, 1968). Se desconoce qué compuestos carbonados son importados desde las células vegetativas, aunque podría tratarse de carbohidratos y en particular de sacarosa (Curatti *et al.*, 2002; Wolk *et al.*, 1994). En los heterocistos, los disacáridos pueden ser hidrolizados en sus componentes, y éstos degradados a través de la vía glucolítica y oxidados a través del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato, proporcionando la energía y el poder reductor necesarios para la fijación de  $N_2$ .

A su vez, los heterocistos proporcionan nitrógeno a las células vegetativas. Unos estudios realizados con nitrógeno radiactivo ( $^{13}N$ ) en *Anabaena* mostraron que el amonio derivado de la fijación del  $N_2$  es asimilado por la acción secuencial de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT) (Thomas *et al.*, 1977). Esta vía, conocida como el ciclo GS-GOGAT, constituye la conexión entre el metabolismo del carbono y el del nitrógeno. La ruta se compone de dos pasos: (i) la glutamina sintetasa cataliza la síntesis de glutamina dependiente de ATP a partir de amonio y glutamato; (ii) la glutamato sintasa cataliza la formación de dos moléculas de glutamato a partir de glutamina y 2-oxoglutarato, lo que requiere poder reductor, aportado por la ferredoxina reducida. Una de las moléculas de glutamato obtenida se recicla para la síntesis de glutamina. A diferencia de la GS, que está fuertemente regulada a nivel de expresión y actividad y se encuentra en los heterocistos, la enzima GOGAT no está regulada por la fuente de nitrógeno y está ausente de los heterocistos (Martín-Figueroa *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 1977). Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se ha propuesto a la glutamina como un posible compuesto nitrogenado que se exporta desde los heterocistos y se ha sugerido la necesidad de importar glutamato desde las células vegetativas como sustrato de la GS. Por otro lado, se cree que el heterocisto posee la maquinaria enzimática necesaria para la biosíntesis de algunos aminoácidos como la alanina o los componentes de la cianoficina: arginina y ácido aspártico (Wolk *et al.*, 1994). Asimismo, existen datos que sugieren la presencia en el heterocisto de las enzimas degradativas de la cianoficina (Gupta y Carr, 1981; Picossi *et al.*, 2004).

La vía de intercambio de moléculas entre las células vegetativas y los heterocistos se desconoce. Se han planteado dos posibilidades: (i) la existencia de un citoplasma continuo entre las células que posibilite el intercambio por difusión; o (ii) la existencia de un espacio periplásmico continuo por el cual las células intercambiarían metabolitos, estando implicadas permeasas de la membrana citoplasmática que mediarían el transporte de las sustancias entre periplasma y citoplasma. Aunque se ha descrito la existencia de uniones intercelulares tipo “microplasmodesmos” (Lang y Fay, 1971; Giddings y Staehelin, 1978), Flores *et al.* (2006) han sugerido que se podría tratar de complejos integrales de membrana más que de conexiones citoplasmáticas. La proteína de membrana SepJ, localizada en los septos entre las células del filamento (Flores *et al.*, 2007), podría estar incluida en tales complejos, pero se desconoce si los mismos conforman pequeños poros proteicos por los que se puedan intercambiar moléculas. Sin embargo, sí se ha visto que la membrana externa es continua a lo largo del filamento (Flores *et al.*, 2006) y se ha demostrado la presencia de un periplasma funcionalmente continuo en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Mariscal *et al.*, 2007).

En el heterocisto, el poder reductor para la reducción de  $O_2$  y  $N_2$  se obtiene mediante la oxidación de compuestos orgánicos. Una variedad de metabolitos pueden ser oxidados por deshidrogenasas con la consecuente reducción de  $NADP^+$  o  $NAD^+$ . Los principales candidatos como donadores de electrones para  $NADP^+$  son la glucosa-6-fosfato (G6P), el 6-fosfogluconato (6PG) y el isocitrato. La G6P y el 6PG son oxidados mediante el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato, muy activo en los heterocistos tanto en condiciones de luz como de oscuridad (Wolk, 1982). De hecho, se ha observado un aumento específico de la actividad G6P deshidrogenasa en los heterocistos (Wolk, 2000). El isocitrato se oxidaría mediante la isocitrato deshidrogenasa. La reducción de  $NAD^+$  está acoplada a la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato y malato por sus correspondientes deshidrogenasas. Concomitantemente con la generación de NADH por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, se produce fosfoenolpiruvato (PEP) que generaría oxalacetato mediante la fosfoenolpiruvato carboxilasa, o piruvato mediante la piruvato quinasa (Neuer y Bothe, 1983). El piruvato puede reducir la ferredoxina en una reacción catalizada por la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (revisado en Wolk, 1994). Por otra parte, la glucólisis probablemente no contribuya de forma significativa al metabolismo de las hexosas fosfato en los heterocistos, ya que la actividad fosfofructoquinasa es baja en los mismos (Böhme, 1987). El NADPH y NADH generados pueden transferir los electrones al fotosistema I o a la cadena respiratoria. Además, el NADPH generado en el heterocisto puede reducir directamente a la ferredoxina vía ferredoxina: $NADP^+$  oxidoreductasa (PetH), cuya actividad se ha determinado que es 14 veces superior a la observada en las células vegetativas (Razquin *et al.*, 1996). El gen *petH* se expresa a partir de dos promotores, uno constitutivo y otro que se utiliza en condiciones de deficiencia de nitrógeno y es funcional en los heterocistos (Valladares *et al.*, 1999). El metabolismo básico del heterocisto se resume en la Figura 1.4.





**Figura 1.4. Rutas metabólicas básicas del heterocisto, desde la degradación de azúcares hasta la producción de glutamina.** Se esquematizan los flujos de nitrógeno, carbono y poder reductor en el heterocisto, así como la transferencia de sustancias entre las células vegetativas y los heterocistos. AcCoA, acetil coenzima A;  $b_6/f$ , complejo del citocromo  $b_6/f$ ; COPP, ciclo oxidativo de las pentosas fosfato; ORT, oxidasas terminales respiratorias; Fru, fructosa; Fd, ferredoxina oxidada; Fd<sub>red</sub>, ferredoxina reducida; Peth, ferredoxina:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa; G6P, glucosa-6-fosfato; 6PG, 6-fosfogluconato; Gln, glutamina; Glu, glutamato; H<sub>2</sub>asa, hidrogenasa; 2OG, 2-oxoglutarato; P, fosfato inorgánico; PEP, fosfoenolpiruvato; PGA, 3-fosfoglicerato; PS I, fotosistema I; R5P, ribulosa-5-fosfato; Triosa-P, triosa fosfato.

### 1.2.3. REGULACIÓN DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN

Las diferencias morfológicas y fisiológicas del heterocisto son la consecuencia de un programa de expresión génica diferencial con respecto al que tiene lugar en las células vegetativas. El desarrollo de los heterocistos en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Frías *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994), *Anabaena variabilis* (Thiel y Pratte, 2001) y *Nostoc punctiforme* (Wong y Meeks, 2002) requiere la proteína NtcA. NtcA es el regulador global del metabolismo del nitrógeno en las cianobacterias (ver siguiente apartado; Herrero *et al.*, 2001), de manera que el proceso de diferenciación se incluye entre las respuestas celulares a las condiciones nitrogenadas del medio, en este caso la carencia de nitrógeno combinado.

Las células detectan la disponibilidad de nitrógeno en el medio y adaptan su metabolismo para asimilar las fuentes de nitrógeno disponibles teniendo prioridad la asimilación de amonio, que es la fuente de nitrógeno energéticamente más económica para la célula. El amonio ejerce una represión metabólica sobre las actividades celulares relacionadas con la asimilación de otras fuentes de nitrógeno (revisado en Flores y Herrero, 1994), para lo cual es necesaria su incorporación a esqueletos carbonados mediante la ruta de asimilación GS-GOGAT (apartado anterior; Meeks *et al.*, 1978). De esta forma, la señal que refleja el estado nitrogenado de la célula debe ser un metabolito intracelular relacionado con el ciclo GS-GOGAT (Flores y Herrero, 1994). Se ha identificado al 2-oxoglutarato (2-OG) como la molécula señal que indica el estado nitrogenado o el balance C/N de la célula (Forchhammer, 1999; revisado en Forchhammer 2004; Herrero *et al.*, 2004): su síntesis depende de la fijación de CO<sub>2</sub> y su consumo de la operación del ciclo GS-GOGAT. Dado que en las cianobacterias el ciclo de Krebs está incompleto al carecer de la actividad 2-OG deshidrogenasa, la principal función del 2-OG es la de proporcionar el esqueleto carbonado para la asimilación de amonio mediante la vía GS-GOGAT. En una situación de deficiencia de nitrógeno combinado en el medio, cabe esperar que el 2-OG se acumule en el interior celular, lo cual se ha observado en cianobacterias unicelulares y filamentosas (Muro-Pastor *et al.*, 2001; Laurent *et al.*, 2005). Unos experimentos realizados *in vivo* con una estirpe derivada de *Anabaena* sp. PCC 7120 que tenía clonado un transportador de 2-OG de *E. coli* mostraron que la adición de 2-OG al medio promueve la diferenciación de heterocistos (Li *et al.*, 2003). También la acumulación de un análogo no metabolizable del 2-OG dispara el proceso de diferenciación incluso en presencia de amonio (Laurent *et al.*, 2005), lo que indica la implicación del 2-OG, y no de metabolitos derivados del mismo, en la señalización del estado nitrogenado de la célula.

En estudios realizados por Smith *et al.* (1987) se observó que existía una correlación entre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y la frecuencia de heterocistos en *Nostoc* sp. PCC 6720. Esto se confirmó al aplicar distintos tratamientos que afectaban a la acumulación de calcio en las células durante el proceso de diferenciación (Smith y Wilkins, 1988; Zhao *et al.*, 1991; Onek y Smith, 1992). Otros estudios más recientes han mostrado que durante el proceso de diferenciación celular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular libre se incrementa a partir de reservas de calcio celulares, observándose un pico a las 4 h de deficiencia de nitrógeno combinado (Torrecilla *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005) y manteniéndose una concentración unas 10 veces mayor en los proheterocistos (células en proceso de diferenciación) y heterocistos que en las células vegetativas (Zhao *et al.*, 2005). La acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  constituye un evento temprano en el proceso de diferenciación, ya que se establece un patrón de células con elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  antes de que se puedan visualizar los proheterocistos (Zhao *et al.*, 2005), y este patrón no se ve afectado por la mutación de *hetR* (Torrecilla *et al.*, 2004; ver más adelante). Se ha propuesto que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en proheterocistos y heterocistos maduros podría deberse a la degradación de CcbP, una proteína de unión a calcio que está ausente en los heterocistos, y la consecuente liberación de calcio (Shi *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2005). De hecho, la sobreexpresión de *ccbP* anula el desarrollo de los heterocistos y su inactivación provoca el desarrollo de heterocistos múltiples contiguos en ausencia de nitrógeno combinado (Zhao *et al.*, 2005).

En los últimos años se han descrito numerosos genes cuyos productos están implicados en el desarrollo de un heterocisto funcional (Golden y Yoon, 1998; 2003; Herrero *et al.*, 2004; Wolk, 2000; Zhang *et al.*, 2006). La mutación de aquellos genes cuyos productos actúan de forma positiva al inicio del proceso (*ntcA*, *hetR*), anula el desarrollo. En el caso de proteínas que ejercen un papel negativo, su mutación puede provocar un incremento en la frecuencia de heterocistos, y eventualmente, la formación de agrupaciones de heterocistos (por ejemplo en los mutantes *patS*). Este fenotipo también se puede generar al sobreexpresar genes de acción positiva (*hetR*). Si el producto génico actúa en una fase tardía del desarrollo, su inactivación produce un fenotipo menos severo, ya que sí hay diferenciación pero puede que ésta sea aberrante, o que el heterocisto no sea funcional (es el caso de los mutantes afectados en genes de la biosíntesis de polisacáridos o glicolípidos de la pared celular del heterocisto).

En la Tabla 1.1, basada en Herrero *et al.* (2004), se recogen algunos de los genes estudiados hasta el momento implicados en el desarrollo o funcionamiento del heterocisto. Aunque se han definido algunas señales clave del proceso de diferenciación, las correspondientes rutas de señalización se desconocen en gran medida.

Tabla 1.1. Genes implicados en el desarrollo y funcionamiento de los heterocistos

Gen	Posible función y/u homología	Referencias
<b>Eventos tempranos</b>		
<i>ntcA</i>	Regulación metabolismo del nitrógeno; autorregulatorio	Frías <i>et al.</i> , 1994; Wei <i>et al.</i> , 1994
<i>nrrA</i>	Proteína reguladora de respuesta	Ehira y Ohmori 2006a; 2006b; Muro-Pastor <i>et al.</i> , 2006
<i>ccbP</i>	Proteína de unión a calcio	Zhao <i>et al.</i> , 2005; Shi <i>et al.</i> , 2006
<i>patA</i>	Formación del patrón celular	Liang <i>et al.</i> , 1992
<i>patS</i>	Formación del patrón celular; inhibición intercelular de la formación de heterocistos	Yoon y Golden, 1998; 2001
<i>hanA</i>	Similar a la proteína HU de <i>Escherichia coli</i>	Khudyakov y Wolk, 1996
<i>hetR</i>	Actividad autoproteolítica y de unión a DNA; autorregulatorio	Buikema y Haselkorn, 1991b; Black <i>et al.</i> , 1993; Zhou <i>et al.</i> , 1998a; Huang <i>et al.</i> , 2004; Khudyakov y Golden, 2004; Risser y Callahan, 2007
<i>hetC</i>	Exportador tipo ABC	Khudyakov y Wolk, 1997; Muro-Pastor <i>et al.</i> , 1999
<i>hetP</i>	Función desconocida	Fernández-Piñas <i>et al.</i> , 1994
<i>hetL</i>	Elemento de acción positiva, no esencial	Liu y Golden, 2002
<i>hetF<sup>s</sup></i>	Interviene en la localización de HetR en las células en desarrollo	Wong y Meeks, 2001
<i>asr1734</i>	Regulador negativo del desarrollo	Wu <i>et al.</i> , 2007
<b>Maduración</b>		
<i>devH</i>	Posible proteína de unión a DNA	Hebbar y Curtis, 2000; Ramírez <i>et al.</i> , 2005
<i>hetN</i>	Mantenimiento del patrón celular	Black y Wolk, 1994; Bauer <i>et al.</i> , 1997; Callahan y Buikema, 2001
<i>hglB</i> , <i>hglC</i> , <i>hglD</i> , <i>hglE<sup>a</sup></i>	Genes estructurales para la biosíntesis de glicolípidos	Black y Wolk, 1994; Bauer <i>et al.</i> , 1997; Campbell <i>et al.</i> , 1997
<i>hglK</i> , <i>devBCA</i> , <i>hgdD</i>	Transporte y deposición de la envuelta de glicolípidos	Black <i>et al.</i> , 1995; Fiedler <i>et al.</i> , 1998; 2001; Moslavac <i>et al.</i> , 2007
<i>prpJ</i>	Fosfatasa; biosíntesis de glicolípidos de la envuelta	Jang <i>et al.</i> , 2007
<i>hepK</i> , <i>devR<sup>a</sup></i>	Sistema de dos componentes; biosíntesis de polisacáridos	Campbell <i>et al.</i> , 1996; Zhu <i>et al.</i> , 1998; Zhou y Wolk., 2003; Lechno-Yossef <i>et al.</i> , 2006
<i>hepC</i> , <i>hepA</i>	Biosíntesis de la envuelta de polisacáridos del heterocisto	Leganés, 1994; Zhu <i>et al.</i> , 1998; Holland y Wolk, 1990
<i>abp2</i> , <i>abp3</i>	Proteínas de unión a DNA necesarias para la expresión de <i>hepC</i> y <i>hepA</i>	Koksharova y Wolk, 2002
<i>hepN</i> , <i>hepS</i>	Histidina quinasa, serina/teonina quinasa; biosíntesis de polisacáridos	Lechno-Yossef <i>et al.</i> , 2006; Ning y Xu, 2004
<i>henR</i>	Proteína reguladora de respuesta; biosíntesis de la envuelta del heterocisto	Lechno-Yossef <i>et al.</i> , 2006
<i>hcwA</i>	Autolisina requerida para la maduración del heterocisto	Zhu <i>et al.</i> , 2001
<i>pbpB</i>	Posible proteína de unión a penicilina	Lázaro <i>et al.</i> , 2001
<i>rfbP</i>	Undecaprenil-fosfato galactosafosfotransferasa	Xu <i>et al.</i> , 1997
<i>pknD</i>	Proteína quinasa	Zhang y Libs, 1998
<i>prpA</i> , <i>pknE</i>	Proteínas fosfatasa y quinasa, respectivamente	Zhang <i>et al.</i> , 1998
<i>xisA</i> , <i>xisC</i> , <i>xisF</i>	Escisomas implicadas en la reordenación de DNA	Revisado en Golden y Yoon, 1998
<i>xisH</i> , <i>xisl</i>	Escisión del elemento de DNA de 55 kb	Ramaswamy <i>et al.</i> , 1997
<i>patB</i>	Proteína con posibles dominios hélice-vuelta-hélice y ferredoxina	Liang <i>et al.</i> , 1993; Jones <i>et al.</i> , 2003
<b>Funcionamiento del heterocisto</b>		
<i>zwf<sup>a</sup></i> , <i>opcA<sup>a</sup></i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y efector alostérico	Summers <i>et al.</i> , 1995; Hagen y Meeks, 2001
Operones <i>cox2</i> , <i>cox3</i>	Oxidasa respiratorias terminales	Jones y Haselkorn, 2002; Valladares <i>et al.</i> , 2003; 2007
<i>peth<sup>b</sup></i>	Ferredoxina-NADP <sup>+</sup> reductasa	Razquin <i>et al.</i> , 1996; Valladares <i>et al.</i> , 1999
<i>fdxH</i>	Ferredoxina	Böhme y Haselkorn, 1988; Masepohl <i>et al.</i> , 1997a
<i>fdxN</i>	Ferredoxina de tipo bacteriano	Mulligan y Haselkorn, 1989; Masepohl <i>et al.</i> , 1997b

Tabla 1.1. (Continuación)

Gen	Posible función u homología	Referencias
<i>Funcionamiento del heterocisto</i>		
Genes <i>nif</i>	Genes estructurales y de maduración de la nitrogenasa	Haselkorn <i>et al.</i> , 1983; Böhme, 1998
<i>hupLS</i>	Hidrogenasa de consumo irreversible	Carrasco <i>et al.</i> , 1995; Oxelfelt <i>et al.</i> , 1998; Happe <i>et al.</i> , 2000
<i>glbN<sup>f</sup></i>	Cianoglobina	Potts <i>et al.</i> , 1992; Hill <i>et al.</i> , 1996
<i>glnA</i>	Glutamina sintetasa	Tumer <i>et al.</i> , 1983; Frías <i>et al.</i> , 1994; Valladares <i>et al.</i> , 2004
<i>argL<sup>d</sup></i>	Biosíntesis de arginina	Leganés <i>et al.</i> , 1998
<i>cphA<sup>e</sup></i> , <i>cphB</i>	Cianoficina sintetasa y cianoficinasa	Ziegler <i>et al.</i> , 2001; Picossi <i>et al.</i> , 2004
<i>idh</i>	Isocitrato deshidrogenasa	Martín-Figueroa <i>et al.</i> , 2000; Papen <i>et al.</i> , 1983

Todos los genes se identificaron primero en *Anabaena* sp. PCC 7120, excepto aquellos identificados en *Nostoc punctiforme<sup>a</sup>*, *Anabaena* sp. PCC 7119<sup>b</sup>, *Nostoc commune<sup>c</sup>*, *Nostoc ellipsosporum<sup>d</sup>* o *Anabaena variabilis<sup>e</sup>*.

Durante el proceso de diferenciación tiene lugar la expresión diferencial de múltiples genes: algunos se expresan únicamente en el heterocisto maduro, como el operón *nifHDK* (que determina los genes estructurales de la nitrogenasa)(Elhai y Wolk, 1990); otros se expresan activamente en las células vegetativas pero no en los heterocistos, como el operón *rbclXS* (que determina la Rubisco) (Elhai y Wolk, 1990); y hay genes con regiones promotoras activas en ambos tipos celulares, como *glnA* (que determina la glutamina sintetasa)(Valladares *et al.*, 2004). Por analogía con el mecanismo de regulación del proceso de esporulación en *Bacillus subtilis* (Kroos *et al.*, 2000), se propuso que la progresión de la diferenciación de los heterocistos podría ajustarse al modelo de cascada de factores sigma. La RNA polimerasa cianobacteriana se compone de un núcleo constituido por cinco subunidades,  $\alpha_2\beta\beta'\gamma$  (Schneider *et al.*, 1987), y un factor  $\sigma$  que media la interacción de la enzima con secuencias de DNA específicas de las regiones promotoras. Los factores sigma se clasifican en tres grupos: el grupo 1 incluye los factores sigma principales, que están muy conservados en secuencia y son esenciales para el crecimiento celular; el grupo 2 incluye factores sigma similares en secuencia y estructura a los del grupo 1 pero que son dispensables; y el grupo 3 corresponde a los factores sigma alternativos, que no se parecen en secuencia ni estructura a los de los otros grupos, reconocen promotores con estructura diferente y controlan procesos específicos como respuestas generales a situaciones de estrés, movilidad, funciones extracitoplasmáticas o esporulación, y tampoco son esenciales. En *Anabaena* sp. PCC 7120 existen doce genes que determinan posibles factores sigma (Yoshimura *et al.*, 2007). Se ha analizado el papel de 6 de estos factores en el contexto del desarrollo y, aunque algunos se expresan de forma transitoria durante el proceso de diferenciación en los proheterocistos, no se ha establecido la implicación específica de ninguno de ellos en el desarrollo de los heterocistos (Aldea *et al.*, 2007; Brahamsha y Haselkorn, 1991, 1992; Khudyakov y Golden, 2001). Los datos obtenidos del estudio de dobles mutantes indican que varios grupos de factores sigma contribuyen a la expresión de genes implicados en el

proceso de diferenciación y que existe cierta redundancia funcional entre ellos (Khudyakov y Golden, 2001).

### NtcA

El gen *ntcA* determina una proteína de la familia de reguladores transcripcionales cuyo representante mejor conocido es la proteína CRP ("cAMP Receptor Protein") de *Escherichia coli*, y que está constituida por más de 369 miembros ampliamente distribuidos entre las bacterias (Korner *et al.*, 2003). NtcA opera el control global del metabolismo del nitrógeno en las cianobacterias mediante la regulación de la expresión de numerosos genes cuyos productos están implicados en la asimilación de nitrógeno. Tiene un papel crucial en el comienzo del proceso de diferenciación del heterocisto al detectar el estado nitrogenado de la célula e iniciar eventos de activación génica que sostienen el proceso de diferenciación (Herrero *et al.*, 2004). Los mutantes *ntcA* no muestran signo alguno de diferenciación (Frías *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994).

La acumulación de 2-OG como consecuencia de la deficiencia de nitrógeno combinado parece ser detectada por NtcA (Laurent *et al.*, 2005; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2003). En experimentos realizados *in vitro* se observó que, aunque en ausencia de 2-OG NtcA presenta capacidad de unión al DNA, la presencia de 2-OG incrementa la afinidad por las secuencias diana (Tanigawa *et al.*, 2002; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002b). Además, el inicio de la transcripción a partir de promotores dependientes de NtcA requiere la presencia de 2-OG (Tanigawa *et al.*, 2002; Valladares *et al.*, sin publicar). Por otro lado, se ha sugerido que NtcA podría estar sujeta a regulación redox (Jiang *et al.*, 1997), aunque esto no se ha confirmado posteriormente (Wisén *et al.*, 2004).

NtcA ejerce su acción sobre la expresión de los genes regulados mediante la interacción con la región promotora de los mismos. NtcA parece actuar como un dímero compuesto por dos subunidades idénticas de aproximadamente 24 kDa que presentan en el extremo carboxilo terminal un dominio hélice-vuelta-hélice (HTH) de unión a DNA (Herrero *et al.*, 2001). El motivo HTH está muy conservado entre las proteínas NtcA de cuya secuencia se dispone, lo cual hace suponer que la secuencia de DNA que reconoce NtcA debe estar altamente conservada en las distintas cianobacterias (Herrero *et al.*, 2001; Luque y Forchhammer, 2008). Ésta está constituida por un palíndromo de secuencia GTAN<sub>8</sub>TAC, en el que los dos nucleótidos externos de cada triplete (subrayados) son los más importantes (Luque *et al.*, 1994; Ramasubramanian *et al.*, 1994; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002a). Se ha determinado que la presencia de los nucleótidos C y A situados en las posiciones segunda y tercera tras el triplete GTA, así como la presencia de T o A flanqueando la secuencia consenso favorecen la unión de NtcA. Los promotores de algunos genes regulados por NtcA no presentan la secuencia consenso; en algunos casos sólo un triplete está alterado y en otros

los dos se desvían del consenso, lo que puede afectar negativamente a la afinidad por NtcA (Jiang *et al.*, 1995; 2000; Luque *et al.*, 2001; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002a).

La estructura del promotor canónico activado por NtcA se compone de un sitio de unión de NtcA centrado aproximadamente en la posición -41,5 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSP, “transcription start point”), separado unas 22 pb de una caja -10 de secuencia TAN<sub>3</sub>T. Esta estructura se ajusta a la de los promotores bacterianos regulados de Clase II, en los que el activador se une en torno a la posición -41,5 solapando y reemplazando la región -35 de interacción con el complejo de la RNA polimerasa (presente en promotores similares a los canónicos  $\sigma^{70}$  de *E. coli*), lo que incrementa la afinidad de la RNA polimerasa por el promotor y favorece la formación del complejo abierto. Se han descrito algunos promotores que se ajustan a los regulados de Clase I, presentando el sitio de unión de NtcA por delante de la posición -41,5 (Herrero *et al.*, 2004). En el caso de los promotores reprimidos por NtcA, como los de los genes *gifA* y *gifB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803, que determinan los factores inactivantes de la glutamina sintetasa de tipo I (García-Domínguez *et al.*, 2000), el sitio de unión de la proteína se localiza por detrás (3') de la posición -41,5, de forma que la unión de NtcA bloquea el acceso de la RNA polimerasa al promotor (Herrero *et al.*, 2001).

Hay otros genes regulados por NtcA cuya expresión tiene lugar desde múltiples promotores que incluyen unos dependientes y otros independientes de NtcA, como sucede con el propio gen *ntcA*, el cual se autorregula. Éste se expresa desde tres promotores que generan los TSPs localizados en las posiciones -49 (P<sub>1</sub>), -136 (P<sub>2</sub>) y -180 (P<sub>3</sub>) respecto al inicio del gen (Muro-Pastor *et al.*, 2002; Ramasubramanian *et al.*, 1996). El uso del promotor P<sub>2</sub> es constitutivo e independiente de la fuente de nitrógeno, mientras que el P<sub>3</sub> se utiliza de forma transitoria durante el proceso de diferenciación. El transcrito generado por el P<sub>1</sub> está presente en cualquier condición de crecimiento pero es más abundante en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado, estando presente en el heterocisto maduro. Al principio del desarrollo, la expresión de *ntcA* se incrementa transitoriamente de forma dependiente de la proteína HetR (ver el siguiente apartado) y de la propia NtcA a partir de los promotores P<sub>1</sub> y P<sub>3</sub> (Muro-Pastor *et al.*, 2002).

La acción de NtcA se requiere no sólo al inicio del proceso de diferenciación, sino también durante el desarrollo y para el funcionamiento del heterocisto maduro. Este requerimiento se debe al papel de NtcA como activador transcripcional de genes tanto estructurales como reguladores cuyos productos participan en el proceso de diferenciación o en el metabolismo del heterocisto. Estos genes activados por NtcA no tienen por qué ser específicos de los heterocistos, ya que algunos son activados en las células vegetativas en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado (como el gen *glnA*).

### HetR

HetR es, aparte de NtcA, el principal factor de regulación positiva implicado en el desarrollo de los heterocistos y en el establecimiento del patrón celular (Buikema y Haselkorn, 1991a; 1991b; Black *et al.*, 1993; Khudyakov y Golden, 2004). Los mutantes *hetR* no muestran ningún signo de diferenciación, mientras que la sobreexpresión de *hetR* produce un fenotipo de múltiples heterocistos contiguos en ausencia de nitrógeno combinado (Buikema y Haselkorn, 1991b). La expresión de *hetR* desde un promotor regulado por cobre ( $P_{petE}$ ) permite la diferenciación de heterocistos aún en condiciones represoras (Buikema y Haselkorn, 2001). El gen *hetR* se autorregula positivamente y la proteína HetR podría modificarse postraduccionalmente en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado (Buikema y Haselkorn, 1991b; Black *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1998b).

Se desconoce el mecanismo de acción de HetR, pero se ha descrito que *in vitro* presenta actividad autoproteolítica (Zhou *et al.*, 1998a) y de unión al DNA, uniéndose a su propio promotor y a las regiones promotoras de *patS* y *hepA* (Tabla 1.1) (Huang *et al.*, 2004). Se ha propuesto que HetR es un nuevo tipo de serina proteasa dependiente de calcio capaz de autodegradarse y de degradar CcbP *in vitro* (Shi *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 1998a). Se ha demostrado que la sustitución S179N elimina la actividad proteasa y la capacidad de diferenciar heterocistos (Buikema y Haselkorn, 1991b; Zhou *et al.*, 1998a). En unos experimentos llevados a cabo *in vitro* se observó que el pentapéptido (RGSGR) de PatS (factor inhibidor del desarrollo) inhibe la capacidad de unión de HetR al DNA (Huang *et al.*, 2004). Por otra parte, estudios recientes llevados a cabo por Risser y Callahan (2007) han mostrado la existencia de tres residuos (D17, G36 y H69) esenciales para el desarrollo de los heterocistos y para el mantenimiento de los niveles de proteína HetR. La situación de estos aminoácidos en la zona próxima al extremo amino sugiere que esta región tiene una función importante en el mecanismo de acción de la proteína HetR.

HetR interviene en el establecimiento del patrón celular, ya que la mutación que da lugar a la sustitución R223W en la proteína provoca un aumento en el número de células diferenciadas en ausencia de nitrógeno combinado alcanzándose el 100% de heterocistos. Esta proteína mutante es insensible a los reguladores negativos de la diferenciación *patS* y *hetN* (Tabla 1.1), lo que sugiere que las correspondientes rutas reguladoras convergen en HetR (Khudyakov y Golden, 2004).

En *Anabaena* sp. PCC 7120 se detecta el transcrito de *hetR* en células creciendo con amonio o nitrato, y su expresión se induce de forma transitoria al principio del proceso de diferenciación (Buikema y Haselkorn, 1991b; Black *et al.*, 1993). Este incremento de la expresión tiene lugar de forma localizada en unas agrupaciones de células en torno al heterocisto en desarrollo (Black *et al.*, 1993) y está afectado en mutantes *ntcA* de las estirpes *Anabaena* sp. PCC 7120 (Frías *et al.*, 1994; Muro-Pastor *et al.*, 2002) y *Nostoc punctiforme* (Wong y Meeks, 2001), pero la base de



tal dependencia se desconoce. La expresión de *hetR* en *Anabaena* sp. PCC 7120 tiene lugar desde varios promotores (Buikema y Haselkorn, 2001; Muro-Pastor *et al.*, 2002), dos de los cuales están regulados por nitrógeno y no se utilizan en un mutante *ntcA* (Muro-Pastor *et al.*, 2002).

Finalmente, se debe mencionar que *hetR* no es un gen exclusivo del proceso del desarrollo de los heterocistos, ya que en *Nostoc ellipsosporum* es necesario también para la diferenciación de los akinetos (Leganés *et al.*, 1994). En la cianobacteria no formadora de heterocistos *Trichodesmium erythraeum*, HetR podría estar implicado en el desarrollo de los diazocitos, otro tipo de células que podrían estar especializadas en la fijación de nitrógeno (El-Shehawy *et al.*, 2003).

### Relación entre NtcA y HetR

Como se ha visto en los apartados anteriores, *ntcA* y *hetR* presentan una dependencia mutua en la activación de su expresión. La activación de *hetR* precede a la de *ntcA* en el transcurso del desarrollo (Muro-Pastor *et al.*, 2002). Esto implica que los niveles basales de NtcA activan la expresión de HetR, y el incremento de expresión de *ntcA* durante el desarrollo requiere la inducción previa de *hetR*. Hay que señalar que el requerimiento por HetR para la inducción de *ntcA* es exclusivo del desarrollo de los heterocistos, ya que la mutación de *hetR* no afecta al crecimiento con nitrato. Se desconoce el mecanismo por el cual NtcA regula la expresión de *hetR* ya que los promotores que generan los TSPs -271 y -728 (que están regulados por NtcA) no presentan sitios de unión de NtcA (Muro-Pastor *et al.*, 2002). Ehira y Ohmori (2006b) han sugerido una vía indirecta de activación por NtcA en la que participaría una proteína de unión a DNA cuya expresión sería dependiente de NtcA y que a su vez interaccionaría con la región promotora de *hetR* controlando su expresión. Se ha propuesto como posible candidato NrrA, cuyo perfil se ajusta al descrito. El gen *nrrA* parece determinar una proteína reguladora de respuesta de un sistema de dos componentes, su expresión se incrementa de forma dependiente de NtcA en respuesta a la falta de nitrógeno combinado (Muro-Pastor *et al.*, 2006), y un mutante *nrrA* presenta un retraso respecto a la estirpe silvestre de 24 h en la adaptación al crecimiento diazotrófico. Se ha visto que la falta de una proteína NrrA funcional afecta a la abundancia de mRNA de genes cuya expresión varía durante el proceso de desarrollo de los heterocistos incluyendo *hetR* (Ehira y Ohmori, 2006a).

La activación de múltiples genes implicados en el desarrollo de los heterocistos requiere las proteínas HetR y NtcA (Cai y Wolk, 1997; Herrero *et al.*, 2004). Dado que NtcA se requiere para la activación de *hetR*, la falta de expresión de genes dependientes de HetR en un fondo mutante *ntcA* podría deberse únicamente a falta de una proteína HetR activa. Sin embargo, numerosos genes de *Anabaena* implicados en estadios intermedios del desarrollo estudiados hasta el momento, así como genes que se expresan en el heterocisto maduro, lo hacen desde promotores reconocibles como tipo NtcA. Alguno de ellos se recogen en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2. Algunos promotores dependientes de NtcA utilizados durante el desarrollo de los heterocistos o en el heterocisto maduro**

Gen (promotor)	Sitio de unión de NtcA <sup>a</sup>	Localización del sitio de unión de NtcA respecto del TSP	Referencia
<i>nrrA</i>	TAGAG <b>TA</b> ACAAAGACT <b>TAC</b> AAAA	-41,5	Muro-Pastor <i>et al.</i> , 2006
<i>hetC</i>	ATCTG <b>TA</b> ACATGAGAT <b>TAC</b> ACAA	-40,5	Muro-Pastor <i>et al.</i> , 1999
<i>glnA</i> (P <sub>1</sub> )	TTCTG <b>TA</b> ACAAAGACT <b>TAC</b> AAAA	-41,5	Ramasubramanian <i>et al.</i> , 1994
<i>devBCA</i>	ATTTG <b>TAC</b> AGTCTGTT <b>TAC</b> CTTT	-39,5	Fiedler <i>et al.</i> , 2001
<i>peth</i> (P <sub>2</sub> )	AATTGACTCATTATTA <b>TAC</b> ATTC	-42,5	Valladares <i>et al.</i> , 1999
<i>nifHDK</i>	AAGAACTTTCACAACT <b>TAC</b> ATCC	-41,5	Valladares <i>et al.</i> , 1999
<i>cphA1</i> (P <sub>2</sub> )	TAGAG <b>TAC</b> CTGAGGTT <b>TAC</b> ACTG	-40,5	Picossi <i>et al.</i> , 2004
<i>ntcA</i> (P <sub>1</sub> )	TTGGG <b>TAT</b> CATTATGA <b>TAC</b> AAAT	-94,5	Ramasubramanian <i>et al.</i> , 1996
<i>cphBA1</i> (P <sub>1</sub> )	AATAG <b>TAT</b> CTAAAAG <b>TAC</b> TAGA	-92,5	Picossi <i>et al.</i> , 2004
<i>cox2</i>	TTCTG <b>TAC</b> CAAAAA <b>TAC</b> CGAG	-238,5	Herrero <i>et al.</i> , 2004
<i>cox3</i>	GATG <b>GTAT</b> TTTTAATT <b>TAC</b> AAAT	-180,5	Herrero <i>et al.</i> , 2004
<sup>b</sup> Consenso	WWYWG <b>TAC</b> .CAR.WR. <b>TAC</b> AAWW		Herrero <i>et al.</i> , 2001

<sup>a</sup> En negrita se señalan aquellas bases de las regiones promotoras que coinciden con la secuencia consenso.

<sup>b</sup> Se muestra la secuencia consenso del sitio de unión de NtcA (W, A o T; Y, C o T; R, A o G).

### 1.3. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

En este trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

1. Estudio de la relación entre NtcA y HetR en la regulación de la expresión de genes del desarrollo de los heterocistos en *Anabaena* sp. PCC 7120.
2. Estudio de la expresión de *ntcA* en el filamento durante el desarrollo de los heterocistos y análisis de la contribución a dicha expresión de cada uno de los promotores de *ntcA* y de los sitios de unión de NtcA.
3. Búsqueda de factores reguladores potencialmente implicados en el proceso de diferenciación de los heterocistos.

Parte de los resultados recogidos en esta memoria han sido ya publicados:

- Olmedo-Verd, E., Flores E., Herrero A. y Muro-Pastor A.M. (2005) HetR-dependent and -independent expression of heterocyst-related genes in an *Anabaena* strain overproducing the NtcA transcription factor. *J. Bacteriol.* 187: 1985-1991.
- Olmedo-Verd, E., Muro-Pastor A.M., Flores E. y Herrero A. (2006) Localized induction of the *ntcA* regulatory gene in developing heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 188: 6694-6699.





## 2. MATERIALES Y MÉTODOS



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

#### 2.1.1. CIANOBACTERIAS

##### 2.1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas

En este trabajo se ha utilizado como material biológico de estudio la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. (también conocida como *Nostoc* sp.) PCC 7120 (ATCC 27893), perteneciente a la Sección IV de la clasificación taxonómica de R. Rippka (Rippka *et al.*, 1979).

También se han utilizado estirpes mutantes derivadas de *Anabaena* sp. PCC 7120, cuyo genotipo se describe en las Tablas 2.1 y 2.2.

**Tabla 2.1. Estirpes mutantes derivadas de *Anabaena* sp. PCC 7120 utilizadas en este trabajo y no generadas en el mismo**

Estirpe	Genotipo	Referencia
CSE2	<i>ntcA</i> ::C.S3	Frías <i>et al.</i> , 1994
216	<i>hetR</i> S179N	Buikema y Haselkorn, 1991b
DR884a	<i>hetR</i> :: <i>luxAB</i>	Black <i>et al.</i> , 1993

**Tabla 2.2. Estirpes mutantes derivadas de *Anabaena* sp. PCC 7120 utilizadas en este trabajo y generadas en el mismo**

Estirpe	Características relevantes	Resistencia a antibióticos
CSEL1	<i>ntcA</i> constitutivo (Con). Integración del plásmido pCSM1 en la región <i>ntcA</i>	Sm Sp
CSEL2	<i>hetR</i> , <i>ntcA</i> (Con). Integración del plásmido pCSM1 en la región <i>ntcA</i> en la estirpe 216 (Tabla 2.1)	Sm Sp
CSEL4a	Integración del plásmido pCSEL22a, que contiene 603 pb de <i>P<sub>ntcA</sub></i> y 6 codones de <i>ntcA</i> fusionados en fase con <i>gfp</i> , en la región <i>ntcA</i>	Sm Sp
CSEL6	Integración del plásmido pCSEL27, que contiene 603 pb de <i>P<sub>ntcA</sub></i> y 6 codones de <i>ntcA</i> fusionados en fase con <i>gfp</i> , en la región <i>nucA</i>	Sm Sp
CSEL7	Integración del plásmido pCSEL31, que contiene 182 pb de <i>P<sub>ntcA</sub></i> y 6 codones de <i>ntcA</i> fusionados en fase con <i>gfp</i> , en la región <i>nucA</i>	Sm Sp
CSEL8	Integración del plásmido pCSEL38, que contiene 143 pb de <i>P<sub>ntcA</sub></i> y 6 codones de <i>ntcA</i> fusionados en fase con <i>gfp</i> , en la región <i>nucA</i>	Sm Sp
CSEL9	Integración del plásmido pCSEL39, que contiene 92 pb de <i>P<sub>ntcA</sub></i> y 6 codones de <i>ntcA</i> fusionados en fase con <i>gfp</i> , en la región <i>nucA</i>	Sm Sp
CSEL10	Integración del plásmido pCSEL41, que contiene 603 pb de <i>P<sub>ntcA</sub></i> con el sitio de unión de <i>NtcA</i> proximal mutado y 6 codones de <i>ntcA</i> fusionados en fase con <i>gfp</i> , en la región <i>nucA</i>	Sm Sp

Tabla 2.2. (Continuación)

Estirpe	Características relevantes	Resistencia a antibióticos
CSEL11	Integración del plásmido pCSEL46, que contiene 603 pb de $P_{ntcA}$ con el sitio de unión de NtcA distal mutado y 6 codones de <i>ntcA</i> fusionados en fase con <i>gfp</i> , en la región <i>nucA</i>	Sm Sp
CSEL12	Integración del plásmido pCSEL49, que contiene 603 pb de $P_{ntcA}$ con los dos sitios de unión de NtcA mutados y 6 codones de <i>ntcA</i> fusionados en fase con <i>gfp</i> , en la región <i>nucA</i>	Sm Sp
CSEL13	Integración del plásmido pCSEL51, que contiene el gen <i>gfp</i> sin promotor, en la región <i>nucA</i>	Sm Sp
CSEL14	Integración del plásmido pCSEL60, que contiene 158 pb de $P_{ntcA}$ y 6 codones de <i>ntcA</i> fusionados en fase con <i>gfp</i> , en la región <i>nucA</i>	Sm Sp
CSEL15	Integración del plásmido pCSEL61, que contiene 158 pb de $P_{ntcA}$ con el sitio de unión de NtcA proximal mutado y 6 codones de <i>ntcA</i> fusionados en fase con <i>gfp</i> , en la región <i>nucA</i>	Sm Sp
CSEL16	Integración del plásmido pCSEL62, que contiene 158 pb de $P_{ntcA}$ con el sitio de unión de NtcA distal mutado y 6 codones de <i>ntcA</i> fusionados en fase con <i>gfp</i> , en la región <i>nucA</i>	Sm Sp
CSEL17	Integración del plásmido pCSEL63, que contiene 158 pb de $P_{ntcA}$ con los dos sitios de unión de NtcA mutados y 6 codones de <i>ntcA</i> fusionados en fase con <i>gfp</i> , en la región <i>nucA</i>	Sm Sp

$P_{ntcA}$ , región promotora de *ntcA*.

#### 2.1.1.2. Medios y condiciones de cultivo

Las cianobacterias se cultivaban en condiciones axénicas empleando el medio BG11 descrito previamente (Rippka *et al.*, 1979) sin  $\text{NaNO}_3$ . Este medio carece de fuente de nitrógeno y se compone de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,3 mM,  $\text{CaCl}_2$  0,24 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2 mM, ácido cítrico 28,5  $\mu\text{M}$ , citrato férrico amónico (17% Fe) 6 mg/l,  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  2,4  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  46  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnCl}_2$  9,1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  1,6  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  0,8  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4$  0,3  $\mu\text{M}$  y  $\text{CoCl}_2$  0,2  $\mu\text{M}$ .

Los medios de cultivo se preparaban a partir de una disolución 100 veces concentrada que contenía todos los componentes excepto el  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , que se añadía antes de autoclavar el medio. Como fuente de nitrógeno combinado se utilizaba  $\text{NaNO}_3$  a concentración final 17,6 mM (medio BG11),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a concentración final 3 mM (medio sólido), 4 mM (medio líquido) ó 6 mM (cuando las células se cultivaban en medio líquido con gaseo (aire: $\text{CO}_2$ )), o urea a concentración 2 mM. En el caso del amonio y la urea, el medio se tamponaba con (TES)-NaOH (pH 7,5) al doble de concentración de la fuente nitrogenada. Las disoluciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , urea y TES se esterilizaban mediante filtración y se añadían al medio después de que éste hubiera sido autoclavado.

Los cultivos se incubaban en una cámara termostatzada a 30°C, en matraces Erlenmeyer de 50 ml (conteniendo 25 ml de medio de cultivo) ó de 100 ml (conteniendo 50 ml de medio de cultivo) de capacidad, con agitación orbital continua (90 rpm) e iluminación superior con luz blanca (75  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), o bien en tubos de 70 ml (conteniendo 40 ml de medio de cultivo), en cilindros de 240 ml (conteniendo 150



ml de medio de cultivo), en frascos de 900 ml (conteniendo 800 ml de medio de cultivo), o en botellas de 5 ó 10 litros de capacidad, con iluminación lateral con luz blanca ( $50\text{-}150\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). En los casos de tubos, cilindros, frascos y botellas, los cultivos se burbujearon con una mezcla estéril de aire y  $\text{CO}_2$  en proporción 99:1 que, además de enriquecer en  $\text{CO}_2$ , permitía una correcta aireación y agitación de los mismos. El cultivo de las células en condiciones de gaseo con aire: $\text{CO}_2$  requería la adición de  $\text{NaHCO}_3$  10 mM a los medios BG11<sub>0</sub> y BG11, denominándose entonces BG11<sub>0</sub>C y BG11C respectivamente.

Para cultivos en cajas de Petri, el medio se solidificaba con Bacto-Agar (Laboratorios Difco) al 1% (p/v), esterilizado en autoclave separadamente de los nutrientes y mezclado con los mismos antes de verter el medio en las cajas. Los cultivos en caja de Petri se incubaban a 30°C con iluminación superior con luz blanca ( $25\text{-}50\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Cuando se requería la adición de antibióticos, éstos se suplementaban a una concentración final de: neomicina (Nm)  $5\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  en medio líquido y  $25\text{-}40\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  en medio sólido; estreptomicina (Sm)  $2\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  en medio líquido y  $2\text{-}5\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  en medio sólido; espectinomicina (Sp)  $2\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  en medio líquido y  $2\text{-}5\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  en medio sólido. Los antibióticos se esterilizaban por filtración.

#### 2.1.1.3. Método de recogida y lavado de células

Las células de *Anabaena* sp. PCC 7120 o estirpes mutantes derivadas se recogían, dependiendo del volumen de cultivo, mediante centrifugación a temperatura ambiente en una centrífuga Heraeus modelo “Megafuge 1.0”, a 4.000 rpm durante 1-10 min (volúmenes pequeños, 5-50 ml), o bien mediante centrifugación a temperatura ambiente o a 4°C en centrífuga Beckman Coulter modelo “Avanti J-25”, utilizando el rotor JLA 16.250 a 6.000 rpm durante 5 min (volúmenes grandes).

Las células para el aislamiento de RNA se recogían mediante filtración por vacío a través de filtros de celulosa (“mixed cellulose ester”) de  $0,45\ \mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore), se lavaban en el mismo filtro con 10 ml de tampón T<sub>50</sub>E<sub>100</sub> (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM [pH 8]) y se resuspendían en el mismo tampón (3 ml/50 ml cultivo), transfiriéndose después a tubos de microcentrífuga, donde se centrifugaban (2 min a 13.000 rpm), descartándose el sobrenadante y congelándose con nitrógeno líquido.

Cuando, por razones experimentales, se requería transferir las células a un medio suplementado con una fuente de nitrógeno diferente de la utilizada para su cultivo, era necesario su lavado. Para ello, las células recogidas por centrifugación se resuspendían en medio BG11<sub>0</sub>C carente de fuente nitrogenada, se centrifugaban y se descartaba el sobrenadante, repitiéndose el proceso dos veces. Las células recogidas por filtración se lavaban en el filtro con BG11<sub>0</sub>C.

#### 2.1.1.4. Experimentos de inducción sincrónica de desarrollo de heterocistos

El trabajo llevado a cabo en esta tesis se enmarca en el estudio del proceso de diferenciación de los heterocistos. El desarrollo sincrónico de heterocistos se inducía mediante la eliminación de la fuente

de nitrógeno combinado del medio de cultivo en el que estuvieran creciendo las cianobacterias. Las células de *Anabaena* sp. PCC 7120 y estirpes derivadas se cultivaban a 30°C en presencia de amonio 6 mM y TES 12 mM (pH 7,5) y los antibióticos correspondientes, en condiciones de gaseo con aire:CO<sub>2</sub> (99:1) y luz (75 µE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>). Cuando el cultivo alcanzaba unos 3-6 µg Chl·ml<sup>-1</sup>, las células se recogían por centrifugación o filtración a temperatura ambiente, se lavaban con medio BG11<sub>0</sub>C y se reinoculaban en un volumen de BG11<sub>0</sub>C similar al volumen del que procedían. Previamente, se tomaba una muestra de las células incubadas en amonio que correspondía al tiempo 0 h. Tras el lavado y reinoculación en medio carente de fuente de nitrógeno combinado, se tomaban muestras a varios tiempos hasta alcanzar las 24 h, cuando se completa el desarrollo de heterocistos en nuestras condiciones de laboratorio. El volumen de muestra retirada variaba en función del análisis que se fuera a realizar; para el aislamiento de RNA se tomaban muestras de 75-150 ml, mientras que para la visualización de la proteína testigo GFP era suficiente con 1 ml.

## **2.1.2. *Escherichia coli***

### **2.1.2.1. Estirpes empleadas**

Las estirpes de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo y las características más relevantes de su genotipo se muestran en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3. Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo**

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5α	F <sup>-</sup> <i>supE44 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> -m <sub>K</sub> +) <i>recA1 girA96</i> (Nal <sup>r</sup> ) <i>endA1 thi-1 relA1 Δ(lacZYA-argF)</i> (Ø80 <i>lacZΔM15</i> ) U169	Hanahan, 1983
HB101	F <sup>-</sup> <i>hsdS20</i> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -) <i>leu supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 recA13 mcrB</i>	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969
GM48	<i>Thr-1 leuB6 thi-1 lacY galK2 galT22 ara14 fhuA tsx dam3 dcm3 supE44</i>	Palmer y Marinus (1994)
ED8654	<i>Lac-3 o lacY1 supE44 supF58 hsdR514</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>-</sup> ) <i>recA56 mcrA1 metB1 lacY galK2 galT22 trpR55</i>	Murray <i>et al.</i> , 1977
BL21 (D3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal [dcm][lon] hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -), una <i>E. coli</i> B) con DE3 (profago de λ portador del gen de la RNA polimerasa de T7)	Studier <i>et al.</i> , 1990
XL-1Blue	F <sup>-</sup> ::Tn10 <i>proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal <sup>r</sup> ) <i>thi hsdR17</i> (r <sub>K</sub> -m <sub>K</sub> +) <i>supE44 relA1 lac</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987

### **2.1.2.2. Medios y condiciones de cultivo**

Las estirpes de *E. coli* se cultivaban en el medio rico Luria-Bertani (LB) que se compone de NaCl 10 g·l<sup>-1</sup>, bactotripton 10 g·l<sup>-1</sup> y extracto de levadura 5 g·l<sup>-1</sup> (Sambrook y Russell, 2001). Para la preparación de medio sólido se añadía agar a una concentración final de 1,5% (p/v). El medio se

esterilizaba en el autoclave. Las estirpes portadoras del plásmido pCSM1 o pCSAM61 (Tabla 2.5) se cultivaban en medio LB suplementado con 2% de glucosa para reducir la expresión basal del gen *ntcA*.

Para los cultivos a pequeña escala en medio líquido, se utilizaban tubos de 20 ml de capacidad con 3 ml de medio, y se incubaban en agitadores orbitales (200 rpm) a 37°C. Los cultivos en medio sólido se realizaban en cajas de Petri y se incubaban a 37°C.

Cuando era necesario, los cultivos se suplementaban con antibióticos a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Ap) 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , kanamicina (Km) 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , cloramfenicol (Cm) 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , estreptomicina (Sm) 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , espectinomicina (Sp) 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Los antibióticos se esterilizaban por filtración.

### 2.1.2.3. Método de recogida de células

Para la recogida de volúmenes inferiores a 1,5 ml a temperatura ambiente se utilizaba una microcentrífuga Eppendorf modelo “Minispin Plus” a 13.000 rpm durante 1 min. Para volúmenes de 1,5 a 50 ml se utilizaba la centrífuga Heraeus modelo “Megafuge 1.0” a 4.000 rpm durante 5 min.

## 2.2. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA

### 2.2.1. PLÁSMIDOS UTILIZADOS

#### 2.2.1.1 Plásmidos no construidos en este trabajo

Los plásmidos utilizados en este trabajo, no construidos durante la realización del mismo, se relacionan en la Tabla 2.4.

**Tabla 2.4. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo**

Plásmido	Resistencia a antibióticos	Características relevantes	Referencia
pAN503	Ap	Fragmento de 7,5 kb conteniendo el gen <i>glnA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 clonado en el plásmido pBR322	Fisher <i>et al.</i> , 1981
pBR322	Ap Tc	Vector de clonación derivado de ColE1	Bolívar <i>et al.</i> , 1977
pCSAM59	Ap	Plásmido que contiene la primera mitad del gen <i>ntcA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 (hasta el sitio <i>Cla</i> I) clonado en pGEM-T	A.M. Muro-Pastor (nuestro laboratorio)
pCSAM60	Ap	Plásmido derivado de pTrc99A que contiene la primera mitad del gen <i>ntcA</i> (hasta el sitio <i>Cla</i> I) de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 clonado en fase con el sitio de inicio de la traducción localizado tras el promotor <i>trc</i>	A.M. Muro-Pastor (nuestro laboratorio)
pCSAM61	Ap	Plásmido derivado de pTrc99A que contiene el gen <i>ntcA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 clonado en fase con el sitio de inicio de la traducción localizado tras el promotor <i>trc</i>	Muro-Pastor <i>et al.</i> , 2002

Tabla 2.4. (Continuación)

Plásmido	Resistencia a antibióticos	Características relevantes	Referencia
pCSAM70	Ap	Plásmido que contiene el gen <i>ntcA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 clonado en fase con el sitio de inicio de la traducción tras el promotor inducible por IPTG en el vector de expresión pQE9. La proteína NtcA recombinante contiene una cola de His en el extremo amino	Muro-Pastor <i>et al.</i> , 1999
pCSAV60	Ap	Plásmido que contiene el gen <i>nifH</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 clonado en pGEM-T	A. Valladares (nuestro laboratorio)
pCSAV61	Ap	Plásmido que contiene el gen <i>rbcl</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 clonado en pGEM-T	A. Valladares (nuestro laboratorio)
pCSAV80	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de ~2 kb que incluye el gen <i>nucA</i> inactivado y parte del gen <i>nuiA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 clonado en pBR322 ( <i>EcoR</i> I- <i>EcoR</i> V)	Muro-Pastor <i>et al.</i> , 2006
pCSAV128	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de 1.107 pb del gen <i>coxB2</i> clonado en pGEM-T	Valladares <i>et al.</i> , 2003
pCSE4	Ap	Plásmido pRL500 portando un fragmento de 5,1 kb que incluye el gen <i>ntcA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 clonado en sitio <i>Hind</i> III	Frías <i>et al.</i> , 1993
pCSE4b	Ap	Plásmido pIC20R que tiene clonado entre los sitios <i>Hind</i> III- <i>Cla</i> I un fragmento de 2,2 kb que incluye la región promotora de <i>ntcA</i> y la primera mitad del gen <i>ntcA</i> (hasta el sitio <i>Cla</i> I) de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	J.E. Frías (nuestro laboratorio)
pCSE26	Ap	Plásmido que contiene el gen <i>nirA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 clonado en pRL500 digerido con <i>Hind</i> III.	Frías <i>et al.</i> , 1997
pCSE67	Ap Sm Sp	Plásmido pIC20R portando la casete C.S3 clonada en el sitio <i>Hind</i> III	J.E. Frías (nuestro laboratorio)
pCSM1	Ap Sm Sp	Plásmido derivado de pCSAM60 conteniendo la casete C.S3 clonada en el sitio <i>EcoR</i> V interno al gen <i>lacI</i> <sup>q</sup>	M. León (nuestro laboratorio)
pCSV3	Sm Sp	Plásmido derivado de pRL500, en el que el gen de resistencia a Ap ha sido escindido con <i>Dra</i> I y reemplazado por la casete C.S3	V. Rodríguez (nuestro laboratorio)
pGEM-T (Easy)	Ap	Vectores empleados para la clonación de fragmentos de DNA generados mediante PCR	Promega
pIC20R	Ap	Vector de clonación derivado de pUC19	Marsh <i>et al.</i> , 1984
pIM11	Bm Km Sm	Plásmido que contiene un fragmento de la región genómica de <i>devBCA</i> y el transposón Tn5-1063, recuperado mediante restricción <i>Cla</i> I del DNA cromosómico del mutante M7 de <i>Anabaena</i> (Wolk <i>et al.</i> , 1991) seguida de religación	Fiedler <i>et al.</i> , 1998
pKEN2-GFPmut2	Ap	Vector de expresión pKEN2 conteniendo el gen <i>gfp-mut2</i> clonado en los sitios <i>Xba</i> I- <i>Pst</i> I	Cormack <i>et al.</i> , 1996 Ezaz-Nikpay <i>et al.</i> , 1994
pQE9	Ap	Vector de expresión para la producción de proteínas fusionadas a un péptido de 6 His	Qiagen
pREP4	Km	Plásmido que contiene el gen <i>lacI</i> <sup>q</sup>	Qiagen
pRL278	Km	Vector para la selección positiva de dobles recombinantes en <i>Anabaena</i> . Contiene el gen <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i>	Black <i>et al.</i> , 1993

Tabla 2.4. (Continuación)

Plásmido	Resistencia a antibióticos	Características relevantes	Referencia
pRL443	Ap Tc	Plásmido conjugativo de amplio espectro, derivado de RP4, capaz de movilizar plásmidos derivados de ColE1	Elhai y Wolk, 1988a
pRL500	Ap	Vector para la selección positiva de plásmidos recombinantes	Elhai y Wolk, 1988b
pRL623	Cm	Derivado de ColK, portador de <i>mob</i> y genes de metilasas de sitios <i>Ava</i> I, <i>Ava</i> II y <i>Ava</i> III	Elhai <i>et al.</i> , 1997
pT7-7120	Ap	Plásmido que contiene el gen <i>mpB</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 clonado en pUC19	Vioque, 1997
pTrc99A	Ap	Vector de expresión que contiene el promotor <i>trc</i> inducible por IPTG	Pharmacia

### 2.2.1.2. Plásmidos construidos en este trabajo

En la Tabla 2.5 se detallan los plásmidos utilizados en este trabajo y construidos durante el mismo.

Tabla 2.5. Plásmidos utilizados construidos en este trabajo

Plásmido	Resistencia a antibióticos	Características relevantes
pCSEL7	Ap	Fragmento del gen <i>nifD</i> (PCR de DNA total de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, cebadores ND1 y ND2) clonado en pGEM-T Easy
pCSEL14	Ap Km	Plásmido derivado de pCSAV80 conteniendo la casete de resistencia C.K1 ( <i>Bam</i> H I) y el gen <i>ntcA</i> ( <i>Eco</i> R V- <i>Bam</i> H I)
pCSEL18	Ap	Fragmento del promotor <i>ntcA</i> (PCR de pCSE4, cebadores NA13 y NA14) clonado en pGEM-T
pCSEL19	Ap	Gen <i>gfp-mut2</i> (PCR de pKEN2-GFPmut2, cebadores GFP1 y GFP2) clonado en pGEM-T
pCSEL20	Ap	Fragmento <i>Cla</i> I- <i>Eco</i> R V de pCSEL18 que contiene el $P_{ntcA}$ , clonado en pIC20R digerido con <i>Cla</i> I- <i>Eco</i> R V
pCSEL21	Ap	Fragmento <i>Eco</i> R V- <i>Pst</i> I de pCSEL19, clonado en pCSEL20 <i>Eco</i> R V- <i>Pst</i> I. Contiene una fusión traduccional <i>ntcA-gfp</i> entre los sitios <i>Cla</i> I- <i>Pst</i> I de pIC20R
pCSEL22a	Sm Sp	Fragmento <i>Eco</i> R I de pCSEL21 que contiene la fusión traduccional <i>ntcA-gfp</i> , clonado en pCSV3 digerido con <i>Eco</i> R I
pCSEL24	Ap Sm Sp	Clonación de la casete de resistencia C.S3 en <i>Bam</i> H I de pCSAV80
pCSEL27	Sm Sp	Fragmento <i>Eco</i> R I- <i>Pst</i> I de pCSEL21; contiene la fusión traduccional <i>ntcA-gfp</i> en pCSEL24 digerido con <i>Eco</i> R I- <i>Pst</i> I
pCSEL28	Ap	Fragmento del promotor <i>ntcA</i> (PCR de pCSE4, cebadores NA14 y NA15) clonado en pGEM-T
pCSEL30	Ap	Fragmento <i>Cla</i> I- <i>Eco</i> R V de pCSEL28 clonado en pCSEL21 digerido con <i>Cla</i> I- <i>Eco</i> R V
pCSEL31	Sm Sp	Fragmento <i>Eco</i> R I- <i>Pst</i> I de pCSEL30 clonado en pCSEL24 digerido con <i>Eco</i> R I- <i>Pst</i> I
pCSEL32	Ap	Fragmento del promotor <i>ntcA</i> (PCR de pCSE4, cebadores NA14 y NA16 ) clonado en pGEM-T Easy
pCSEL33	Ap	Fragmento del promotor <i>ntcA</i> (PCR de pCSE4, cebadores NA14 y NA17) clonado en pGEM-T Easy

Tabla 2.5. (Continuación)

Plásmido	Resistencia a antibióticos	Características relevantes
pCSEL35	Ap	Fragmento del promotor <i>ntcA</i> , producto de PCR obtenido con el método “Megacebador” con NA18, NA19 (cebadores mutagénicos) y NACla y NA14 (cebadores flanqueantes), y pCSE4 como molde, clonado en pGEM-T
pCSE36	Ap	Fragmento <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V de pCSEL32 clonado en pCSEL21 digerido con <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V
pCSEL37	Ap	Fragmento <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V de pCSEL33 clonado en pCSEL21 digerido con <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V
pCSEL38	Sm Sp	Fragmento <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I de pCSEL36 clonado en pCSEL24 digerido con <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I
pCSEL39	Sm Sp	Fragmento <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I de pCSEL37 clonado en pCSEL24 digerido con <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I
pCSEL40	Ap	Fragmento <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V de pCSEL35 clonado en pCSEL21 digerido con <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V
pCSEL41	Sm Sp	Fragmento <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I de pCSEL40 clonado en pCSEL24 digerido con <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I
pCSEL44	Ap	Fragmento del promotor <i>ntcA</i> , producto de PCR obtenido con el método “Megacebador” con NA20, NA21 (cebadores mutagénicos) y NACla y NA14 (cebadores flanqueantes), y pCSEL18 como molde, clonado en pGEM-T
pCSEL45	Ap	Fragmento <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V de pCSEL44 clonado en pCSEL21 digerido con <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V
pCSEL46	Sm Sp	Fragmento <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I de pCSEL45 clonado en pCSEL24 digerido con <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I
pCSEL47	Ap	Fragmento del promotor <i>ntcA</i> , producto de PCR obtenido con el método “Megacebador” con NA20, NA21 (cebadores mutagénicos) y NACla y NA14 (cebadores flanqueantes) y el plásmido pCSEL35 como molde, clonado en pGEM-T.
pCSEL48	Ap	Fragmento <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V de pCSEL47 clonado en pCSEL21 digerido con <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V
pCSEL49	Sm Sp	Fragmento <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I de pCSEL48 clonado en pCSEL24 digerido con <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I
pCSEL50	Ap	Fragmento <i>EcoR</i> V- <i>Pst</i> I de pCSEL19; contiene el gen <i>gfp</i> sin región promotora, clonado en pIC20R digerido con <i>EcoR</i> V- <i>Pst</i> I
pCSEL51	Sm Sp	Fragmento <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I de pCSEL50 clonado en pCSEL24 digerido con <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I
pCSEL52	Ap	Fragmento del promotor <i>ntcA</i> (PCR de pCSEL18, cebadores NA14 y NA30) clonado en pGEM-T
pCSEL53	Ap	Fragmento del promotor <i>ntcA</i> (PCR de pCSEL35, cebadores NA14 y NA30) clonado en pGEM-T
pCSEL54	Ap	Fragmento del promotor <i>ntcA</i> (PCR de pCSEL44, cebadores NA14 y NA31) clonado en pGEM-T
pCSEL55	Ap	Fragmento del promotor <i>ntcA</i> (PCR de pCSEL47, cebadores NA14 y NA31) clonado en pGEM-T
pCSEL56	Ap	Fragmento <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V de pCSEL52 clonado en pCSEL21 digerido con <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V
pCSEL57	Ap	Fragmento <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V de pCSEL53 clonado en pCSEL21 digerido con <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V
pCSEL58	Ap	Fragmento <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V de pCSEL54 clonado en pCSEL21 digerido con <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V
pCSEL59	Ap	Fragmento <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V de pCSEL55 clonado en pCSEL21 digerido con <i>Cla</i> I- <i>EcoR</i> V
pCSEL60	Sm Sp	Fragmento <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I de pCSEL56 clonado en pCSEL24 digerido con <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I
pCSEL61	Sm Sp	Fragmento <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I de pCSEL57 clonado en pCSEL24 digerido con <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I
pCSEL62	Sm Sp	Fragmento <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I de pCSEL58 clonado en pCSEL24 digerido con <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I
pCSEL63	Sm Sp	Fragmento <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I de pCSEL59 clonado en pCSEL24 digerido con <i>EcoR</i> I- <i>Pst</i> I

## 2.2.2. AISLAMIENTO DE DNA

### 2.2.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Para el aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se empleó el método basado en la lisis alcalina de las células (Sambrook y Russell, 2001). Las células contenidas en 3 ml de cultivo se recogían mediante centrifugación (13.000 rpm, 2 min) en tubos de microcentrífuga y se resuspendían en 100 µl de disolución I (Tris-HCl 25 mM, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM [pH 8]). A continuación se añadían 200 µl de disolución II (NaOH 0,2 N, SDS 1% [p/v]) y se agitaba brevemente, provocando la lisis celular. Se añadían entonces 150 µl de disolución III (acetato potásico 5 M [pH 4,8]), se homogeneizaba agitando suavemente, se incubaba en hielo durante 5 min y se centrifugaba (13.000 rpm, 5 min a 4°C). El sobrenadante obtenido se transfería a un tubo limpio y se sometía a dos extracciones sucesivas, una con fenol:cloroformo (1:1, [v/v]) y otra con cloroformo, separándose las fases mediante centrifugación (2 min a 13.000 rpm). El DNA se precipitaba con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (1 h, -20°C). Tras centrifugar las muestras (13.000 rpm, 15 min a 4°C), el precipitado se lavaba con etanol al 70% (v/v), se secaba al aire y se resuspendía en 25 µl de agua desionizada de alta calidad o tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM [pH 8]).

Para el aislamiento de DNA plasmídico de alta calidad, utilizado para secuenciación, se empleaba el sistema comercial “NucleoSpin Plasmid” (Macherey Nagel) basado también en la lisis alcalina de las células.

### 2.2.2.2. Aislamiento de DNA total de cianobacterias

El aislamiento de DNA total de *Anabaena* sp. PCC 7120 se realizaba siguiendo el método descrito por Cai y Wolk (1990). Células procedentes de 25-50 ml de cultivo se recogían por centrifugación y se resuspendían en 400 µl de tampón T<sub>1/10</sub>E (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM [pH 8]). A la suspensión celular se le añadían 150 µl de perlas de vidrio (0,25-0,30 mm de diámetro, previamente lavadas con ácido nítrico y agua destilada, y esterilizadas a 180°C), 20 µl de SDS al 10 % (p/v) y 400 µl de una mezcla de fenol:cloroformo (1:1, [v/v]). La mezcla resultante se sometía a cuatro ciclos de agitación con vortex (1 min) e incubación en hielo (1 min). El lisado se centrifugaba (15 min a 13.000 rpm, 4°C) y el sobrenadante se sometía a sucesivas extracciones con un volumen de fenol (1 vez), un volumen de fenol:cloroformo (1:1, [v/v]) (2 veces), y un volumen de cloroformo (1 vez). Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa final se precipitaban mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y 0,1 volúmenes de acetato potásico 3 M (pH 5,2) (1 h, -20°C). Tras centrifugar las muestras (15 min a 13.000 rpm, 4°C), el precipitado se lavaba con etanol al 70% (v/v), se secaba al aire y se resuspendía en 30 µl de agua desionizada de alta calidad o tampón T<sub>1/10</sub>E.

### **2.2.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA**

La concentración de DNA de las muestras se determinaba por comparación con muestras de concentración conocida. Para ello, alícuotas de la muestra problema o diluciones de la misma se sometían a electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (apartado 2.2.4), utilizándose como patrón de tamaño y carga una cantidad conocida de DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Cla* I o el marcador de tamaño comercial "DNA molecular Weight Marker X" (Roche), que se resolvían simultáneamente.

### **2.2.4. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA**

La separación de fragmentos de DNA se realizaba mediante electroforesis en geles de agarosa (Sambrook y Russell, 2001) de concentración variable 0,7-2% (p/v) preparados en tampón TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM [pH 8]) diluido al 50%. Las muestras que contenían RNA se trataban con RNasa (concentración final 0,05  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) antes de ser sometidas a electroforesis y se suplementaban con 0,1 volúmenes de tampón de carga 10x (glicerol 50% [v/v], azul de bromofenol 0,4% [p/v], xileno cianol FF 0,4% [p/v]). Para la detección del DNA se añadía bromuro de etidio a una concentración de 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Las electroforesis se llevaban a cabo en aparatos horizontales DNA Sub Cell (Bio-Rad). Para determinar el tamaño de los fragmentos sometidos a electroforesis se empleaban como patrón los fragmentos de DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Cla* I, o el marcador de tamaño comercial "DNA Molecular Weight Marker X" (Roche). El DNA se visualizaba iluminando los geles con un transiluminador de luz ultravioleta.

### **2.2.5. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA**

La purificación de fragmentos de DNA en disolución o en geles de agarosa se realizaba mediante unión específica del DNA a columnas con matriz de fibra de vidrio proporcionadas en el sistema comercial "GFX<sup>TM</sup>" (Amersham), siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante.

### **2.2.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA DNA POLIMERASA (PCR)**

#### **2.2.6.1. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa**

La amplificación de DNA mediante PCR se realizaba en un termociclador "Tpersonal" (Whatman-Biometra). La reacción se llevaba a cabo en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ , en una mezcla que contenía: 1-5 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP), 25-50



pmol de cada cebador y la polimerasa con su tampón correspondiente (Tabla 2.6). Como DNA molde se utilizaba DNA genómico aislado de cianobacterias o DNA plasmídico obtenido de *E. coli*. El resultado de la PCR se analizaba en geles de agarosa según se describe en el apartado anterior.

El programa de amplificación era el siguiente: 2 min a 95°C (desnaturalización), seguido de aproximadamente 30 ciclos de 1 min a 95°C de desnaturalización del DNA, 1 min de unión de los oligonucleótidos a temperatura variable dependiendo de la  $T_m$  (temperatura de fusión) de éstos, y un tiempo de extensión por cada kb de DNA a extender (variable según la enzima utilizada) a 72°C. El proceso se terminaba con una incubación a 72°C durante 10 min.

**Tabla 2.6. Descripción de las DNA polimerasas utilizadas en este trabajo**

DNA polimerasa (Suministrador)	Unidades /reacción	Tampón (1x)	Tiempo de extensión
Taq Polimerasa (C. Viral)	2,5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 16,6 mM, Tris-HCl 67 mM (pH 8,8), 0,1% Tween-20, MgCl <sub>2</sub> 2 mM	15 s / kb DNA
Pfu DNA polimerasa (Stratagene)	2,5	Tris-HCl 20 mM (pH 8,8), MgSO <sub>4</sub> 2 mM, KCl 10 mM, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 mM, 1% Tritón X-100, 1 mg/ml BSA	2 min / kb DNA
DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i> (Engelke <i>et al.</i> , 1990)	Desconocido (preparación no comercial)	Tris-HCl 12 mM (pH 8,3), KCl 60 mM, MgCl <sub>2</sub> 1,8 mM, Tween-20 0,004%, gelatina 0,012%	1,5 min / kb DNA

En las Tablas 2.7a y 2.7b se especifican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados durante este trabajo como cebadores en reacciones de amplificación, en ensayos de extensión de cebadores (apartado 2.3.5) y/o en reacciones de secuenciación (apartado 2.2.8).

**Tabla 2.7a. Desoxioligonucleótidos utilizados en los apartados 3.1 y 3.2 de Resultados**

Las dianas de restricción utilizadas se indican mediante subrayado y los nucleótidos que han sido cambiados se señalan en negrita.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición respecto al sitio de inicio de la traducción del gen que se indica	
CB2-4	CACTCTGGACTCTAATTGCTG	+20 a +40	<i>coxB2</i>
CB2-5	GACGTTGTATGCAATGTCTC	+974 a +955	<i>coxB2</i>
CK3-1	CAGAGCAGCCGATTGTCTGTT		
CK3-2	CTGATAAGTGAGCTATTCAC		
GA3	GGATTTTATGTCAAAGTTGACCCC	-146 a -169	<i>glnA</i>
GA13	CTCCTTCTCTGCCAATTTC	-6 a -24	<i>glnA</i>
GFP1	GGAGATATC <b>C</b> CATATGAGTAAAGG	-12 a +11	<i>gfp-mut2</i>
GFP2	AACAGAAGCTTGCAATGCCTG	+909 a +889	<i>gfp-mut2</i>
GFP4	CAAGAATTGGGACAACTCC	+46 a +28	<i>gfp-mut2</i>

Tabla 2.7a. (Continuación)

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición respecto al sitio de inicio de la traducción del gen que se indica	
NACla	<b>CATCGATT</b> CATTTGTACAGC	-604 a -584	<i>ntcA</i>
NA1	GCTCCGGTTGCCATCTGACG	+59 a +40	<i>ntcA</i>
NA4	GGTGTA <b>AGC</b> TTAGGTAATTAG	-64 a -40	<i>ntcA</i>
NA5	GAAGGG <b>CCATGG</b> TCGTGAC	-8 a +11	<i>ntcA</i>
NA8	TGATGATTATTAAGGGCG	-301 a -283	<i>ntcA</i>
NA13	CCAGTCAGATTCAGCATAG	-645 a -627	<i>ntcA</i>
NA14	GGC <b>GATATC</b> TTGTGTCACG	+24 a +6	<i>ntcA</i>
NA15	GGAGT <b>ATCGAT</b> GAAGAACTGC	-194 a -174	<i>ntcA</i>
NA16	AGTTGGGT <b>ATCGAT</b> TGAAC	-156 a -137	<i>ntcA</i>
NA17	GT <b>ATCGAT</b> AGGTAAACGGTGC	-100 a -80	<i>ntcA</i>
NA18	GTACGTTTGAC <b>ATT</b> AGGAAAGTACAG	-120 a -95	<i>ntcA</i>
NA19	CCTA <b>ATGT</b> CAAACGTACAAC	-104 a -123	<i>ntcA</i>
NA20	GTTGG <b>CATT</b> CATTATGAACAAATAACC	-155 a -129	<i>ntcA</i>
NA21	GTTCATAATGA <b>ATG</b> CCAACTTTTGC	-137 a -161	<i>ntcA</i>
NA30	<b>ATCGAT</b> AAAGTTGGGTATC	-164 a -146	<i>ntcA</i>
NA31	<b>ATCGAT</b> AAAGTTGG <b>CATT</b> C	-164 a -146	<i>ntcA</i>
NA32	<b>GAATTC</b> CGGCATTGGGTAGGG	-27 a -9	<i>ntcA</i>
ND1	CTTTCGGTACCATGCACTTC	+329 a +348	<i>nifD</i>
ND2	TTCATAGAACGGTAGCAGTG	+860 a +868	<i>nifD</i>
NH1	GTA CTGCAAGGGGCGTGTGGC	-333 a -310	<i>nifH</i>
NH4	CCTATTGGTAGCTTCTGCGGG	+888 a +868	<i>nifH</i>
Nir-15	GCAACAGACCGAGATCATCG	+130 a +149	<i>nirA</i>
Nir-16	CCCCATTCAATCAATTAGCC	+884 a +866	<i>nirA</i>
NUC1	GCGTCAAT <b>CCATGGG</b> AA	-10 a + 7	<i>nucA</i>
NUC2	GACCTATTTAC <b>GAATTC</b> TCAA	+ 843 a +822	<i>nucA</i>
NUI3	AGCTGTCAATGTCTACCAC	+193 a +175	<i>nuiA</i>
O18	ATTTATTAATGTCAACCACTACC	+1423 a +1400	<i>devB</i>
O34	ATGTCAAGGGTGACGGAAG	+1 a +19	<i>devB</i>
pBR322	GAGTAAGTAGTTCGCCAG		
M13-Reverso	GAGGAAACAGCTATGAC		
M13-Universal	GTAAAACGACGGCCAGT		
RL3	CTACTGGTACTTGGACGAC	+188 a +206	<i>rbcL</i>
RL4	CTTCACGAGCCAAGTTACGAC	+1324 a +1304	<i>rbcL</i>
55kb-1	GTAGATCCAGACGTTGTAGAG	+37 a +57	<i>nifS</i>
55kb-2	TCAAGGAGAGCAGAATCG	+934 a +917	<i>nifS</i>

Tabla 2.7b. Desoxioligonucleótidos utilizados en el apartado 3.3 de Resultados

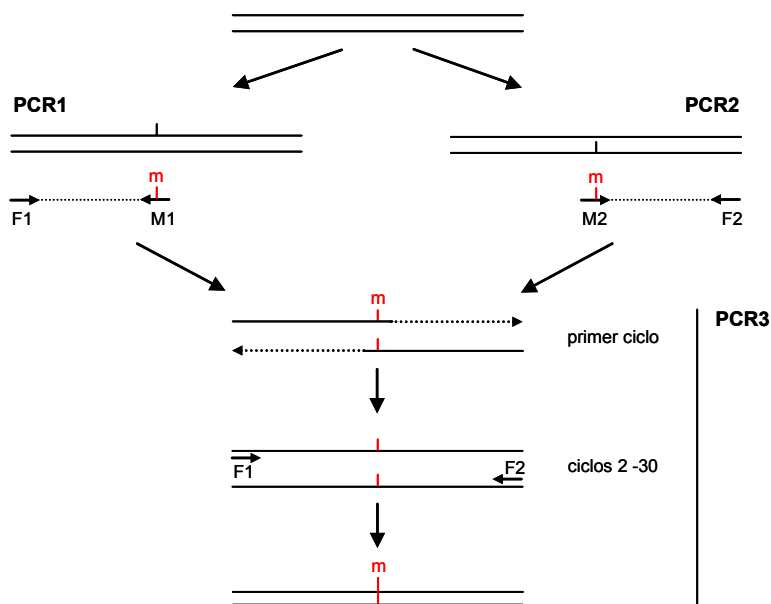
Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
alr0237-1	CAGGCAAAGCCAACAGCAC	alr3593-1	TGAAAAACCCCGACACAGAAG
alr0237-2	TGTTGAGCCGTTTCTGCC	alr3593-2	AGTCACGCAATCCTAACAGTCC
alr0585-1	ACCAGCTACCGCAATCTG	all3678-1	GAGGCGATGCACGGAGTAAATA
alr0585-2	CGGGAACAGGCATTTTCAT	all3678-2	CAAGGCGCTGCAAGTCAAA
all0844-1	CTTTGCAGCTGTGGATGC	alr3716-1	GATACCATCTTCGCGGAAG
all0844-2	GGACATAAGTTGAGTCTCGG	alr3716-2	CAATCGAATCAGACAGTTCACG
alr1008-1	GCATACCTTACATCATCAAGG	alr3832-1	ACGGCAGCACCAATTAGTAGTC
alr1008-2	GCAGAATTAGCGATGATTCTC	alr3832-2	CGAGTCGAGGAGGGTAGTCTTA
all1076-1	GCAATATCCACCTGCATAC	alr3921-1	CGTCATTGTGCGTTATCAG
all1076-2	CATCTATCGCCACTATCTG	alr3921-2	CAGATGGGGTAGAACTTGC
alr1207-1	GATCCAGAAGTGGTCAAGG	all3953-1	AGAAGTACCCTGATGTGG
alr1207-2	GATTTGCGGGTCTGCATC	all3953-2	GTGGAGTACACCCATCTG
alr1209-1	GACCATTCTTAGTCCAGC	all3989-1	GGAAGCAAGATTGTGTTGAC
alr1209-2	ATGACCATACTGCTTACTGG	all3989-2	CCATCAACCAAGCTAAAGC
alr1238-1	CTAGATGCGGAAGACCCAGAG	all4092-1	GCCTCGCAAAACCTCATCT
alr1238-2	CGACTACCAGCAGCGTGAC	all4092-2	ATTCTGCTGTGTTTCTCCATA
all1239-1	GCAAGAAATAGAGCGCTGAC	all4144-1	CGTTTCCGAGTATCAAGTG
all1239-2	TGCTGGTTACGTTCTCTTGC	all4144-2	TGTGATCCTACAGGTGCG
alr1240-1	ATGCGAGGACGAAGACAG	alr4149-1	GGCTGGCAACAGTTAGTAGAG
alr1240-2	ATTGCCTCTTCTAGCTTGAG	alr4149-2	TCCCAATACCGTTGATGG
alr1301-1	TGTGACTCCTTCAATGTG	all4248-1	GCGTCATATTACTACACACC
alr1301-2	CCTTGATTTCTGGTGTAAC	all4248-2	CAATTCACTGTGCCATAGC
all1338-1	GAAACGACCTCAACCTTAGCAG	all4252-1	GGAAGTACAAGCAGTCAG
all1338-2	GGGTTGGTTTCTCTTCTCAGG	all4252-2	TGAGGAATAGCTGTAGTC
alr1562-1	CGTACAGAAGGTTTCAGGTG	all4294-1	GTATCTTGAGTGTGGCTGGAG
alr1562-2	GGTTTGATGTATTCGCTGG	all4294-2	CCAACAATACCATCAGCG
all1692-1	CCTGATATCGCCATTGATG	alr4331-1	GAACAGCAGCAGCAATTACG
all1692-2	CTTCCACCGTCATCTTGG	alr4331-2	GACGACAATCCGATTAC
alr1700-1	CTGATGCCTTCGCCTGAATC	all4337-1	GCAGCAATCACCATGACC
alr1700-2	CGATTTGGATATGCAGAGTG	all4337-2	CCGAACCTCTGACGATGG
all1782-1	TTTCCGGGACAACAGATG	all4343-1	CACCTCGTTCAACACCAC
all1782-2	TCGCGGACGCAAGAAAGT	all4343-2	AGTCCACAACAATGCGAG
all1810-1	CCCTCCTCCTCAAGATTTCTGC	alr4404-1	TGTGCTGTTTTCTCACCC
all1810-2	TCCATGCGGGTAAGAGATTGAT	alr4404-2	ACGATGACAACCTTATCGC
all1872-1	CATCGTGGAGTATGGTCAG	alr4571-1	ATTGGAGGTGGACTAGCTGG
all1872-2	GTAGTTACTTGCGCTTTGC	alr4571-2	TGCAAACTGCGCGCCAAG
all1875-1	GGTCTAGTGAATACTACAAGCC	all4623-1	GCAATCAAGTCCACATTAC
all1875-2	AATCTATCCCACTGTAGCG	all4623-2	GGAACATCACAGTTGCTTTG
alr1901-1	CACTGGTGAACCCATACG	alr4851-1	GCTGCGGAAATTGCTCTGA
alr1901-2	GATACCATCCCCAAGCAC	alr4851-2	GCTTCTTCTGTCTTCGCTG
all2004-1	TGCAGACTATGGACAACG	alr4877-1	ACTGGACGATTCTTTCC
all2004-2	TGGACTGTAGTAATGGCG	alr4877-2	TTCAGTTACTGCGATGTGAC
alr2780-1	TGAACCAAGTGTATGTTGTCC	alr7083-1	AAACACGGGCAGATTACACCTA
alr2780-2	CCAGTAGGTACCTTCATGG	alr7083-2	AAGCCCCAACTCCAACAATGATA
alr3425-1	TGTGGACATATCAAGCTAGCAG	all7185-1	ACCACCGCAGTAAATCTAACC
alr3425-2	GTCATCACCACGACCAATCAC	all7185-2	TATGCGGCTGAGTCCAAAGTA

### 2.2.6.2. Procedimiento del "Megacebador" para introducir alteraciones de secuencia en el DNA

Para la mutagénesis dirigida de los sitios de unión de NtcA de la región promotora del gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 se usó el procedimiento del "Megacebador" descrito en Ausubel *et al.* (2006) y esquematizado en la Figura 2.1.

El procedimiento implica el concurso de tres reacciones de PCR. En las dos primeras, independientes entre sí, se utiliza como molde el DNA del plásmido donde está clonada la secuencia en la que se pretende introducir el cambio y como cebadores un oligonucleótido que incorpora la mutación deseada y otro flanqueante situado en un extremo del fragmento. Los oligonucleótidos mutagénicos utilizados en estas reacciones son parcialmente complementarios entre sí y los flanqueantes están situados en los extremos del fragmento de DNA que se va a clonar. Los productos de las reacciones de PCR se resuelven en un gel de agarosa (apartado 2.2.4) y se purifican (apartado 2.2.5). La tercera reacción de PCR emplea como molde una mezcla de los productos purificados de las dos reacciones anteriores, denominados megacebadores, y como cebadores los dos oligonucleótidos flanqueantes, que se añaden tras un primer ciclo de reacción de extensión. El producto final se clonaba en el vector pGEM-T o pGEM-T Easy (Tabla 2.4).

Para comprobar que el fragmento de DNA en cuestión había incorporado el cambio deseado y ninguno otro adicional, se secuenciaba el fragmento de interés del plásmido (apartado 2.2.8).



**Figura 2.1. Mutagénesis dirigida: método del "Megacebador"**

Las reacciones de amplificación 1 y 2 (PCR1 y PCR2) se realizan en tubos independientes. El DNA resultante (megacebadores) se purifica y utiliza como molde para una tercera reacción de amplificación (PCR3). En la PCR3 hay un primer ciclo en el que los megacebadores actúan de molde y cebadores, y en el segundo ciclo se añaden los oligonucleótidos flanqueantes. M1, M2: oligonucleótidos mutagénicos complementarios entre sí; F1, F2: oligonucleótidos flanqueantes; m: mutación puntual incorporada. Con línea parcialmente discontinua se indica el DNA amplificado en la reacción de PCR.

## **2.2.7. DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE DNA MEDIANTE HIBRIDACIÓN EN FILTRO CON SONDA RADIATIVA (ANÁLISIS DE SOUTHERN)**

### **2.2.7.1. Transferencia de DNA de geles de agarosa a filtros de nylon**

El DNA digerido con la enzima de restricción correspondiente se sometía a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% (p/v). Antes de la transferencia, el gel se sumergía en una disolución de HCl 0,25 M con agitación suave durante 20-30 min para hidrolizar parcialmente el DNA y facilitar el proceso de transferencia. El gel se lavaba varias veces con agua destilada y se procedía a la transferencia por capilaridad a la membrana de nylon “Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>” (Amersham) en condiciones alcalinas durante 12-15 h usando como vehículo de transferencia una disolución de NaOH 0,4 N (Ausubel *et al.*, 2006). Terminada la transferencia, la membrana se lavaba con SSPE 2x (véase más abajo) y se dejaba secar para permitir la fijación del DNA.

### **2.2.7.2. Hibridación de DNA con sondas radiactivas**

Para la hibridación con sonda radiactiva del DNA fijado a un filtro de nylon, el filtro era incubado durante 2 h a 65°C (prehibridación) y agitación moderada con una mezcla de SSPE 5x, disolución Denhardt 5x, SDS 0,5% (p/v) y DNA de esperma de arenque desnaturalizado (incubación de 5 min a 100°C seguida de inmediato enfriamiento en hielo) a 100 µg·ml<sup>-1</sup>. Posteriormente se añadía la sonda marcada radiactivamente (apartado 2.2.9.5A), previamente desnaturalizada a 100°C durante 5 min, y se dejaba hibridando durante 12-15 h a 65°C.

Tras la hibridación, el filtro se lavaba con agitación moderada durante dos períodos de 15 min con una disolución que contenía SSPE 2x y SDS 0,1% (p/v), y durante 15 min con una disolución de SSPE 1x y SDS 0,1% (p/v), a 65°C.

Disoluciones utilizadas:

- SSPE 20x: NaCl 3 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M (pH 7,4), EDTA 0,02 M .
- Disolución Denhardt 100x: ficoll 2% (p/v), polivinilpirrolidona soluble 2% (p/v), BSA fracción V 2% (p/v).

### **2.2.7.3. Detección de la radiactividad**

La detección y el análisis de las áreas radiactivas en los filtros se realizaba mediante autorradiografía electrónica con el sistema “Cyclone Storage Phosphor System” y el programa de análisis de imágenes “Optiquant” (Packard).

## **2.2.8. SECUENCIACIÓN DEL DNA**

Para el análisis rutinario de secuencias de DNA amplificadas por PCR, las muestras se enviaban al servicio de secuenciación automática de DNA de Secugen S.L. Para otros fines se utilizaba el procedimiento que se describe a continuación.

### **2.2.8.1. Reacción de secuenciación**

Las reacciones de secuenciación incluidas en los experimentos de extensión de cebador y de protección frente a la degradación por DNasa I se llevaban a cabo según el método descrito por Sanger *et al.* (1977), basado en la parada aleatoria por incorporación de didesoxirribonucleótidos (ddNTP) durante la reacción de polimerización de cadenas de DNA generadas a partir del cebador. El DNA a secuenciar (1-2 µg) se desnaturalizaba en presencia de NaOH 0,4 M durante 10 min a temperatura ambiente. El NaOH se eliminaba pasando la muestra por una columna de Sephadex G-50. Las reacciones de secuenciación se llevaban a cabo con el conjunto de reactivos denominado "T7 Sequencing Kit" (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se realizaba una reacción de elongación a partir de un cebador que apareaba en zonas adyacentes (en el vector utilizado para la clonación del fragmento) o en el interior del inserto que se deseaba secuenciar. La mezcla de reacción correspondiente se dividía posteriormente en cuatro partes iguales que se procesaban separadamente para llevar a cabo el proceso de terminación, añadiéndose a cada una de ellas uno de los cuatro ddNTP. El marcaje radiactivo de las cadenas se realizaba con [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-thio dATP (1000 Ci·mmol<sup>-1</sup>) (PerkinElmer).

### **2.2.8.2. Electroforesis vertical de alta resolución en geles de urea-poliacrilamida**

El producto de la reacción de secuenciación se analizaba mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (Sambrook y Russell, 2001). Los geles se preparaban al 6% (p/v) de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 30:1) en tampón TBE 1x conteniendo urea 4,7 M y se polimerizaban con persulfato amónico (APS) al 0,08% (p/v), usando como catalizador de la polimerización TEMED 0,1% (v/v). Se empleaba un aparato de electroforesis modelo "Hoefer SQ3 Sequencer" (Hoefer Scientific Instruments) a una potencia de 60 W y una temperatura de 50-60°C.

Terminada la electroforesis, el gel se transfería a papel Whatman 3 MM y se secaba al vacío durante 1 h a 80°C en un secador de geles Bio-Rad modelo "583". La detección de la señal radiactiva se realizaba según se describe en el apartado 2.2.7.3.

## 2.2.9. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL DNA

### 2.2.9.1. Restricción del DNA

Las endonucleasas de restricción empleadas fueron suministradas por Roche, New England Biolabs o Pharmacia y se utilizaban según las instrucciones del fabricante correspondiente.

Las restricciones de DNA total de cianobacterias para análisis de Southern (apartado 2.2.7) se llevaban a cabo con tiempos de incubación prolongados (12-15 h), empleando cantidades de enzima no inferiores a  $20 \text{ U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$  de DNA.

Las restricciones de plásmidos o preparaciones de DNA total que contuvieran RNA se llevaban a cabo en presencia de  $1 \mu\text{g}$  de RNasa A de páncreas bovino (Roche) previamente tratada como se describe en Sambrook y Russell (2001).

### 2.2.9.2. Desfosforilación del DNA

La desfosforilación de los extremos 5' de vectores linearizados se llevaba a cabo con el fin de evitar la religación del vector cuando se quería clonar un fragmento de DNA no seleccionable. El DNA se incubaba durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$  en Tris-acetato 10 mM, acetato magnésico 10 mM y acetato potásico 50 mM con 1 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Amersham), tras lo cual se añadía otra unidad de enzima y se incubaba a  $37^\circ\text{C}$  durante otros 30 min. La reacción se detenía añadiendo EDTA 16 mM e incubando durante 15 min a  $70^\circ\text{C}$ . La preparación obtenida se sometía a electroforesis en geles de agarosa y el plásmido linearizado se purificaba como se describe en el apartado 2.2.5.

### 2.2.9.3. Relleno de extremos 3' recesivos

Para obtener extremos romos en fragmentos de DNA cortados con enzimas de restricción que dejaban extremos 3' recesivos, se utilizaban tratamientos de relleno con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Roche). El DNA se incubaba durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$  en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5),  $\text{MgCl}_2$  10 mM, DTT 1 mM, BSA  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , suplementado con los dNTPs correspondientes a una concentración final de 0,05 mM y 2 U de enzima Klenow. La reacción se detenía mediante incubación a  $65^\circ\text{C}$  durante 10 min.

### 2.2.9.4. Ligación del DNA

Para ligaciones entre fragmentos de DNA se empleaba la ligasa de DNA del bacteriófago T4 proporcionada por varias casas comerciales (New England Biolabs, Dominion MB). La reacción se llevaba a cabo en un volumen de 10-15  $\mu\text{L}$  a una temperatura de  $20^\circ\text{C}$  durante 5 h según las

indicaciones del fabricante. Las moléculas producidas durante esta reacción se utilizaban para transformar células de *E. coli*.

#### **2.2.9.5. Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA**

Según el experimento que se fuera a realizar, se llevaba a cabo un marcaje radiactivo diferente de fragmentos de DNA.

A. Marcaje uniforme de fragmentos de DNA. Para ello se utilizó el juego de reactivos “Ready-to-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)” (Amersham) basado en la extensión de cebadores de secuencia aleatoria, que suministra una mezcla de reacción liofilizada que contiene dATP, dGTP, dTTP, 4-8 U de la enzima Klenow y una mezcla de oligodesoxirribonucleótidos de secuencia aleatoria. Aproximadamente 25-100 ng de DNA desnaturalizado se incubaban 30 min a 37°C con la mezcla de reacción y 25 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3.000 Ci·mmol<sup>-1</sup>) (Amersham). Los fragmentos de DNA marcados de esta forma eran utilizados como sondas radiactivas en análisis de Southern y northern.

B. Marcaje en los extremos 3´recesivos de moléculas de DNA. Una cantidad de 0,5-1 µg del fragmento que se deseaba marcar se incubaba durante 30 min a 37°C con 2 U de la enzima Klenow (Roche), 10 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3.000 Ci·mmol<sup>-1</sup>) (Amersham) y 0,05 mM de los otros tres dNTPs, en el tampón recomendado por el fabricante. Los fragmentos de DNA marcados de esta forma eran utilizados en ensayos de retardo en gel.

C. Marcaje en los extremos 5´de oligonucleótidos o fragmentos de DNA generados por PCR. Se utilizaban 25 pmol de oligonucleótido o de fragmento de DNA y 30 µCi de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP (3.000 Ci·mmol<sup>-1</sup>) (Amersham). La reacción se llevaba a cabo durante 1 h a 37°C en presencia de 20 U de la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 (Roche) en Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM y EDTA 0,1 mM. Los oligonucleótidos marcados de esta forma eran utilizados en ensayos de extensión de cebadores y en reacciones de PCR para obtener los fragmentos de DNA utilizados en ensayos de protección frente a la degradación por DNasa I o en ensayos de retardo en gel.

En los tres casos, los oligonucleótidos no incorporados se eliminaban por filtración de la muestra en columnas de Sephadex G-50 (caso A) o G-25 (casos B y C).

En el caso del marcaje de oligonucleótidos para ensayos de protección frente a la degradación por DNasa I (C), la muestra se precipitaba con acetato amónico 2,5 M (pH 7,5), glucógeno 0,016 µg·µl<sup>-1</sup> y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, tras lo cual se lavaba con etanol 70% (v/v), se secaba y se resuspendía en agua desionizada de alta calidad. La eficiencia del



marcage se estimaba cuantificando 1  $\mu$ l de la muestra radiactiva obtenida en un contador de centelleo Beckman LS 2800.

## 2.3. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA

### 2.3.1. AISLAMIENTO DE RNA

El procedimiento empleado es una modificación del método descrito por Ausubel *et al.* (2006) para bacterias Gram-negativas. Las células de un volumen de 75-150 ml de cultivo se recogían por filtración (apartado 2.1.1.3), se lavaban con 10 ml de T<sub>50</sub>E<sub>100</sub> (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM [pH 8]) y se congelaban con nitrógeno líquido. El sedimento correspondiente a 50 ml de cultivo se resuspendía en 400  $\mu$ l de disolución de rotura STET (sacarosa 8% [p/v], Tritón X-100 5% [v/v], EDTA 50 mM y Tris-HCl 50 mM [pH 8]), añadiéndose a continuación 24  $\mu$ l de una disolución 200 mM del complejo vanadil-ribonucleósido (inhibidor de RNasas, New England Biolabs), 150  $\mu$ l de perlas de vidrio de 0,45  $\mu$ m de diámetro (tratadas como se describe en el apartado 2.2.2.2), 200  $\mu$ l de fenol y 200  $\mu$ l de cloroformo. La mezcla resultante se sometía a 3 ciclos de agitación con vortex (3 min) e incubación en hielo (3 min). La suspensión obtenida se centrifugaba a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C. Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa se precipitaban con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto frío (1 h a -20°C). Posteriormente, se recogían por centrifugación a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C y se resuspendían en 400  $\mu$ l de agua tratada con DEPC (agua desionizada de alta calidad con DEPC 0,1% [v/v], incubada 4 h a 37°C y autoclavada). Esta suspensión se sometía a cuatro extracciones sucesivas, dos con fenol:cloroformo (1:1, [v/v]) y dos con cloroformo. Posteriormente, los ácidos nucleicos se volvían a precipitar como se ha descrito anteriormente. El precipitado se lavaba con etanol al 70% (v/v), se dejaba secar al aire y se resuspendía en 300  $\mu$ l de agua tratada con DEPC. El DNA contaminante de estas preparaciones se eliminaba tratando las muestras con DNasa I libre de RNasa (Roche) según las indicaciones del fabricante. Tras una nueva extracción con fenol:cloroformo (1:1, [v/v]), el RNA se precipitaba y resuspendía en un volumen final de 30-50  $\mu$ l de agua tratada con DEPC.

### 2.3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RNA

La cuantificación del RNA contenido en las muestras se realizaba espectrofotométricamente, determinándose la A<sub>260nm</sub> (Sambrook y Russell, 2001). El coeficiente de extinción empleado era  $\epsilon=0,020 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### **2.3.3. ELECTROFORESIS DE RNA EN GELES DE AGAROSA**

Los geles para la electroforesis de RNA se preparaban a una concentración de agarosa del 1% (p/v) en tampón MOPS 1x y formaldehído al 2% (v/v). El tampón MOPS 1x consistía en: MOPS 40 mM, acetato sódico 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,2).

Las muestras, preparadas en un volumen final de 28 µl, contenían: 20-50 µg de RNA en un volumen de 7 µl, 1,4 µl de tampón MOPS 10x, 4,9 µl de formaldehído al 37% (v/v) y 14 µl de formamida. Tras una incubación a 95°C durante 3 min, las muestras se enfriaban en hielo, se suplementaban con 1/5 en volumen de tampón de carga (EDTA 1 mM [pH 8], azul de bromofenol 0,25% [p/v], xileno cianol FF 0,25% [p/v] y glicerol 50% [v/v]), se cargaban en el gel y se sometían a electroforesis a 120 V.

Para determinar el tamaño de los transcritos sometidos a análisis se empleaban como patrones el marcador de tamaño “ssRNA ladder” (New England Biolabs) o una mezcla de RNA ribosómicos. La detección de los mismos se realizaba tiñendo con bromuro de etidio la fracción de gel que contenía el marcador una vez terminada la electroforesis y visualizando con luz UV como se explica en el apartado 2.2.4. Alternativamente, para visualizar el RNA unido a la membrana de nylon, ésta se humedecía con SSPE 2x y se incubaba, con agitación orbital, en una disolución de tinción (azul de metileno 0,02% [p/v] y acetato sódico 50 mM [pH 5,2]) durante 10 min a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de colorante, el filtro se lavaba con abundante agua.

### **2.3.4. DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE RNA MEDIANTE HIBRIDACIÓN EN FILTRO CON SONDA RADIATIVA (ANÁLISIS DE NORTHERN)**

#### **2.3.4.1. Transferencia de RNA de geles de agarosa a filtros de nylon**

Tras la electroforesis de las muestras de RNA, el gel se sometía a tres períodos de 5 min de lavado con agua destilada para eliminar el formaldehído, y se equilibraba durante 10 min en SSPE 10x (apartado 2.2.7.2). A continuación, el RNA se transfería a un filtro de nylon “Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>” (Amersham), equilibrado durante 10 min en tampón SSPE 10x, mediante aplicación de vacío durante 1 h, utilizando un aparato TransVac TE80 (Pharmacia Biotech). Como disolución de transferencia se usaba NaOH 100 mM. Posteriormente, el filtro se incubaba durante 10 min sobre un papel Whatman humedecido con NaOH 100 mM, se sumergía brevemente en SSPE 2x y se secaba a 80°C durante 15 min.

#### **2.3.4.2. Hibridación de RNA con sondas radiactivas**

Para la hibridación con una sonda radiactiva del RNA fijado a un filtro de nylon, el método seguido era similar al descrito para el análisis de Southern (apartado 2.2.7), variando únicamente el

lavado del filtro. El filtro se lavaba dos veces durante 10 min a temperatura ambiente manteniéndolo en una disolución de SSPE 2x y SDS al 0,1%, y una vez durante 15 min a 65°C en una disolución de SSPE 1x y SDS al 0,1% con agitación moderada.

Como control de la cantidad de RNA cargada en cada pocillo y de la transferencia del RNA a la membrana, se realizaban ensayos de northern en los que se hibridaba la membrana que se quería analizar con una sonda del gen *mnpB* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (que determina el RNA de la ribonucleasa P y se expresa constitutivamente). El fragmento de DNA se obtenía mediante PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos M13-Universal y M13-Reverso como cebadores (Tabla 2.7a) y el plásmido pT7-7120 (Tabla 2.4) como molde.

Los filtros se podían reutilizar, y para ello se eliminaba la sonda hibridada mediante incubación de la membrana durante 1 h a temperatura ambiente y agitación moderada en una disolución de SDS 0,5 % (p/v) que se añadía hirviendo.

#### 2.3.4.3. Detección de la radiactividad

Las señales de hibridación se visualizaban y cuantificaban según se describe en el apartado 2.2.7.3.

#### 2.3.5. ENSAYO DE EXTENSIÓN DE CEBADOR

La determinación del extremo 5' de moléculas de mRNA se llevaba a cabo mediante un ensayo de extensión de un cebador. Para esto se utilizaban oligonucleótidos marcados terminalmente con la enzima T4 polinucleótido quinasa y [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP ( $3.000 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$ ) (Amersham) según se describe en el apartado 2.2.9.5C. Para permitir la unión del oligonucleótido a la secuencia complementaria en el RNA se utilizaba una mezcla que contenía, en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$ : Tris HCl 10 mM (pH 8), KCl 150 mM, EDTA 1 mM (pH 8), 5-25  $\mu\text{g}$  de RNA total y 2 pmol de oligonucleótido marcado radiactivamente. La mezcla resultante se incubaba a 85°C durante 10 min, con el fin de desnaturalizar el RNA, y posteriormente a 50°C durante 1 h, para permitir el apareamiento del cebador con el RNA. Esta mezcla se utilizaba para la reacción de extensión en un volumen final de 45  $\mu\text{l}$  conteniendo: Tris-HCl 50 mM (pH 8), KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, los cuatro dNTPs a concentración final de 0,25 mM cada uno, DTT 10 mM, y 100 U de transcriptasa inversa SuperScript™ II (Invitrogen). Tras una incubación de 1 h a 47°C, se trataba durante 15 min a 37°C con 100  $\mu\text{l}$  de una mezcla que contenía 0,04  $\mu\text{g}$  de RNasa A libre de DNasas (Roche) y 0,2  $\mu\text{g}$  de DNA de esperma de arenque (Roche), y se hacía una extracción con fenol:cloroformo (1:1, [v/v]). El DNA monocatenario sintetizado se precipitaba junto con el DNA de esperma de arenque (DNA "transportador") con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol

absoluto frío y se resuspendía en un tampón que contenía: formamida 97,5% (v/v), xileno cianol FF 0,3% (p/v), azul de bromofenol 0,3% (p/v) y EDTA 10 mM (pH 8) (Sambrook y Russell, 2001). Estas muestras se cargaban en un gel de urea-poliacrilamida (al 6% de poliacrilamida) (apartado 2.2.8.2) paralelamente a una reacción de secuenciación que se utilizaba como estándar de tamaño (apartado 2.2.8.1).

## **2.4. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

### **2.4.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES CIANOBACTERIANOS**

Los extractos crudos de cianobacterias se obtuvieron siguiendo dos procedimientos, según la cantidad de extracto requerido.

#### **2.4.1.1. Rotura con perlas de vidrio y TCA**

En el caso de requerir pequeñas cantidades (análisis de western de las estirpes CSEL1 y CSEL2), los extractos celulares se preparaban mediante rotura con perlas de vidrio y TCA. Un volumen de cultivo conteniendo 20 µg de clorofila se centrifugaba, concentrándose las células en tubos de microcentrífuga. Se añadían 500 µl de TCA al 10% y una cantidad equivalente a 75 µl de perlas de vidrio (0,25-0,30 mm de diámetro). La mezcla se sometía a tres ciclos de agitación con vortex (1 min) e incubación en hielo (1 min). A continuación se volvían a añadir 500 µl de TCA al 10%, la mezcla se transfería a un tubo limpio descartándose las perlas de vidrio y se incubaba en hielo al menos 30 min, tras lo que se centrifugaba 15 min a 13.000 rpm y 4°C. El precipitado se resuspendía en 200 µl de acetona fría (4°C) y se centrifugaba 10 min a 13.000 rpm y 4°C. El nuevo precipitado, secado al aire, se resuspendía en 50 µl de tampón de carga para electroforesis desnaturalizante (apartado 2.4.5).

#### **2.4.1.2. Rotura con prensa de French**

Las células de un cultivo de 900 ml conteniendo 2-5 µg Chl·ml<sup>-1</sup> se recogían por centrifugación (apartado 2.1.1.3) a 4°C. El sedimento se resuspendía en tampón de lisis (ver apartado 2.4.3), a razón de 3 ml de tampón por gramo de células, y se le añadía el inhibidor de proteasas PMSF (Sigma) a una concentración final de 1 mM. A continuación, la suspensión celular se sometía a dos ciclos de rotura (20.000 psi) en una prensa de French (SLM-AMINCO). El lisado celular se centrifugaba 10 min a 15.000 rpm y 4°C en una centrífuga Sorvall RC5C, rotor SE12, para eliminar las membranas y restos celulares. Por último, el sobrenadante se sometía a ultracentrifugación durante 1 h a 45.000 rpm y 4°C en una ultracentrífuga Beckman L8-80M, rotor 80Ti. El sobrenadante obtenido constituía el extracto crudo libre de células y se congelaba a -20°C.

### 2.4.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El contenido de proteína de los extractos crudos y otras preparaciones libres de células se determinaba según el método descrito por Bradford (1976) usando el reactivo correspondiente según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad). A continuación se medía la absorbancia de la muestra a 595 nm. Para cada determinación se realizaba una curva patrón con cantidades conocidas de seroalbúmina bovina.

Para determinar el contenido de proteína total de muestras de células completas se empleaba el método descrito por Lowry *et al.* (1951), con las modificaciones introducidas por Markwell *et al.* (1978). La muestra, en un volumen final de 200  $\mu$ l, se suplementaba con 50  $\mu$ l de NaOH 0,5 N y 750  $\mu$ l de solución C consistente en una mezcla en proporción 100:1 de las disoluciones A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% [p/v], NaOH 0,4% [p/v], tartrato sódico-potásico 0,16% [p/v] y SDS 1% [p/v]) y B ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  4% [p/v]). Tras agitación con vortex e incubación durante 5 min a 37°C, se añadían 75  $\mu$ l de reactivo de Folin-Ciocalteus (Merck) diluido en agua (1:1, [v/v]), se agitaba y se incubaba de nuevo durante 5 min a 37°C. A continuación, se medía la absorbancia a 750 nm. Para cada determinación se realizaba una curva patrón con cantidades conocidas de seroalbúmina bovina.

### 2.4.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE *Anabaena* sp. PCC 7120 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR HEPARINA

La fracción de las proteínas de *Anabaena* sp. PCC 7120 que presenta afinidad por la heparina se purificaba a partir de un extracto crudo libre de células (obtenido según se describe en el apartado 2.4.1.2) mediante cromatografía de afinidad por heparina con una columna “Hi Trap Heparin HP 1 ml” (Amersham) en un sistema FPLC de Pharmacia según las instrucciones del fabricante. El extracto crudo se preparaba en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8), EDTA 0,1 mM, Tritón X-100 0,1% (v/v) y glicerol 10%, suplementado con PMSF 1 mM. El método utilizado para la cromatografía consistía en el equilibrado de la columna con 10 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8), EDTA 0,1 mM, Tritón X-100 0,1% (v/v), glicerol 10% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  100 mM, seguido de la inyección de la muestra y lavado de la fracción de muestra retenida en la columna con 15 ml del tampón de equilibrado. La elución de las proteínas se llevó a cabo con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 M preparado en el mismo tampón. Las proteínas eluidas se separaban mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 12% (apartado 2.4.5) y se visualizaban con azul de Coomassie (apartado 2.4.7.1).

## **2.4.4. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA NtcA RECOMBINANTE**

### **2.4.4.1. Purificación mediante cromatografía de afinidad por heparina**

#### **A. Preparación del extracto**

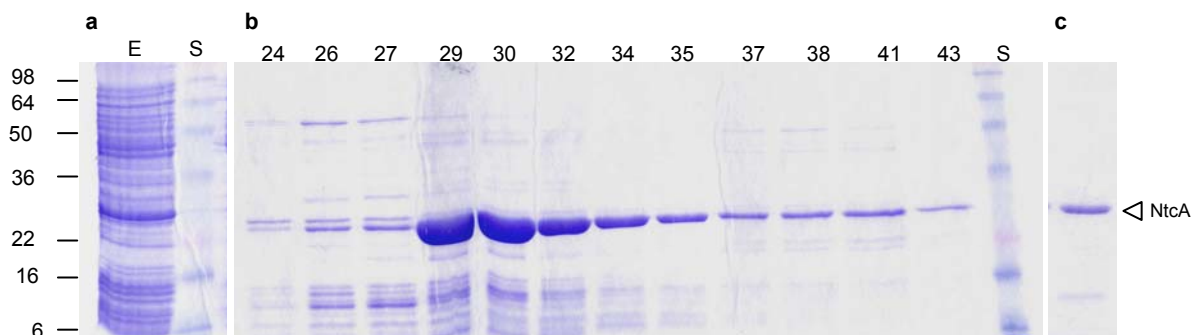
Para la purificación de NtcA recombinante se utilizaba la estirpe DH5 $\alpha$  de *E. coli* (Tabla 2.3) con el plásmido pCSAM61 (Tabla 2.4), en el que *ntcA* está clonado en el vector de expresión pTrc99A bajo el control del promotor *trc* (Tabla 2.4).

Se partía de un preinóculo de células de *E. coli* conteniendo el plásmido pCSAM61 en medio LB suplementado con 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de ampicilina y 2% (p/v) de glucosa (37°C, 10-12 h). Un volumen de 25 ml procedente del cultivo anterior se lavaba con LB para eliminar la glucosa y se reinoculaba en 250 ml de LB conteniendo 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de ampicilina, incubándose a 37°C con agitación. Cuando el cultivo alcanzaba una densidad óptica a 600 nm de 0,6 se le añadía IPTG a una concentración final de 1 mM. Tras 3 h de incubación, las células se recogían por centrifugación, se lavaban con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8) y se congelaban a -20°C.

Para la obtención del extracto libre de células, las células se resuspendían en tampón de lisis (tampón fosfato sódico 20 mM [pH 7], NaCl 0,5 M, glicerol 10%, sacarosa 10% y PMSF 5 mM) a razón de 3 ml por gramo de células, y la suspensión se sometía a dos ciclos de rotura (20.000 psi) en una prensa de French. El lisado celular se centrifugaba 10 min a 15.000 rpm y 4°C en una centrífuga Sorvall RC5C, rotor SE12, para eliminar las membranas y restos celulares. Por último, el sobrenadante se sometía a ultracentrifugación durante 30 min a 41.000 rpm y 4°C en una ultracentrífuga Beckman L8-80M, rotor 80Ti. El extracto crudo libre de células obtenido se congelaba a -20°C.

#### **B. Cromatografía de afinidad**

La proteína NtcA se purificaba a partir de la fracción soluble del extracto libre de células mediante cromatografía de afinidad por heparina con una columna "Hi Trap Heparin HP 1 ml" (Amersham) en un sistema FPLC de Pharmacia según las instrucciones del fabricante. El método utilizado consistía en el equilibrado de la columna con 10 ml de tampón fosfato sódico 20 mM (pH 7), NaCl 0,5 M y glicerol 10%, seguido de la inyección de la muestra y el lavado de la columna con el mismo tampón de equilibrado (15 ml). La elución de las proteínas se realizaba utilizando un gradiente de NaCl de 0,5 a 1,5 M preparado en tampón fosfato sódico 20 mM (pH 7) y glicerol 10%. Las proteínas purificadas se visualizaban mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida al 12% (apartado 2.4.5) y tinción con azul de Coomassie (apartado 2.4.7.1) (Fig. 2.2).



**Figura 2.2. Purificación de la proteína NtcA recombinante.** a) Fracción soluble del extracto crudo libre de células (E). b) Muestra de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de afinidad por heparina con un gradiente de NaCl de 0,5 a 1,5 M. c) Muestra correspondiente a la fracción 33 dializada según se describe en el texto. El patrón de tamaños se indica como “S”.

### C. Diálisis de la proteína purificada

La utilización posterior de la proteína en ensayos de retardo en gel o ensayos de protección frente a la degradación por DNasa I requería una concentración de sal inferior a la que presentaba la muestra tras la purificación. Por ello, se dializó la muestra frente a un volumen adecuado de tampón fosfato sódico 20 mM (pH 7), NaCl 0,25 M y glicerol 10 % utilizando un sistema de ultrafiltración “Amicon Ultra-4” (Millipore) con una tamaño de corte de 10.000 Da según las instrucciones del fabricante.

#### 2.4.4.2. Purificación mediante cromatografía de afinidad por níquel

La inducción por IPTG de la expresión de la proteína NtcA de *Anabaena* sp. PCC 7120 con cola de histidinas, codificada en el plásmido pCSAM70 (Tabla 2.4), así como la preparación del extracto de la estirpe inducida y purificación por cromatografía de afinidad, se realizó como se describe en Muro-Pastor *et al.* (1999).

#### 2.4.5. ELECTROFORESIS ANALÍTICA EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA

La separación analítica de proteínas en condiciones desnaturalizantes mediante electroforesis en geles de poliácridamida se llevaba a cabo según el procedimiento descrito por Laemmli (1970) tal y como se describe en Sambrook y Russell (2001), utilizando aparatos Miniprotean II o Miniprotean III de Bio-Rad.

El gel de separación preparado en tampón Tris-HCl 375 mM (pH 8,8) tenía una concentración de acrilamida:bis-acrilamida (30:0,8) del 10-15%, mientras que el gel de empaquetamiento preparado en tampón Tris-HCl 125 mM (pH 6,8) tenía una concentración de

acrilamida:bis-acrilamida (30:0,8) del 4%. Ambos geles contenían SDS 0,1 % (p/v) y se empleaban APS 0,05% y TEMED 0,1% como catalizadores de la reacción de polimerización.

Las muestras se mezclaban con 1/4 de su volumen de tampón de carga 4x, que contenía: tampón Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), glicerol 20 % (v/v), SDS 4 % (p/v), 2-mercaptoetanol 10 % (v/v) y azul de bromofenol 0,0025% (p/v). La desnaturalización de las muestras se llevaba a cabo calentando a 100°C durante 3 min y la electroforesis se desarrollaba a temperatura ambiente, aplicando un voltaje constante de 200 V. El tampón de electroforesis contenía Trizma Base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% ajustando el pH final a 8,3.

Se utilizaban como patrones de peso molecular los suministrados por Invitrogen (SeeBlue<sup>R</sup> Plus2 Prestained Standard) o Bio-Rad (Prestained SDS-PAGE Low Range).

Tras la visualización de las proteínas (apartado 2.4.7), los geles se conservaban en ácido acético al 10 % (v/v) en agua o se secaban utilizando un secador de geles de Bio-Rad modelo “583”.

#### **2.4.6. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL**

La separación analítica de proteínas en condiciones desnaturalizantes según su punto isoeléctrico (pI) y masa molecular se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Para la separación de las muestras según el pI se utilizaban tiras de isoelectroenfoque de 18 cm con un rango de pH no lineal de 3 a 11. La separación según el peso molecular se llevaba a cabo mediante electroforesis desnaturalizante en gel al 12,5 % de poliacrilamida.

#### **2.4.7. TINCIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA**

##### **2.4.7.1. Tinción con azul de Coomassie R-250**

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se visualizaban fijándolas y tiñéndolas mediante inmersión de los geles en una disolución de azul de Coomassie R-250 (Sigma) 0,25% (p/v), ácido acético 10% (v/v) y metanol 45% (v/v) en agua. Tras 15 min de tinción a temperatura ambiente, los geles se lavaban varias veces con una disolución de metanol 45% (v/v) y ácido acético 10% (v/v), en agua. Las proteínas se visualizaban como bandas de color azul. En el caso de que fuese a llevarse a cabo el análisis posterior de alguna banda mediante MALDI-TOF, las disoluciones de tinción y lavado contenían sólo 1% de ácido acético.



#### 2.4.7.2. Tinción con nitrato de plata

La detección de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida mediante tinción con nitrato de plata tiene lugar con mayor sensibilidad (1 ng) que con la tinción con azul de Coomassie (40 ng). Se utilizaba el juego de reactivos “PlusOne Silver Staining Kit” (Amersham) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Cuando se iba a llevar a cabo el análisis posterior por huella peptídica, el protocolo de tinción se variaba eliminando el uso de glutaraldehído y formaldehído, incompatible con el análisis de MALDI-TOF.

#### 2.4.8. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A FILTROS DE NITROCELULOSA Y DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS (ANÁLISIS DE WESTERN)

Para experimentos de inmunodetección de proteínas con anticuerpos policlonales, tras la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, las proteínas se transferían del gel a membranas de nitrocelulosa “Transblot Transfer Medium” de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Bio-Rad) utilizando el sistema de transferencia semiseca “Nova-blot” (Pharmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizaba a temperatura ambiente durante 1 h a una intensidad constante de  $1 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ , utilizando como tampón de transferencia Trizma Base 48 mM [pH 8], SDS 0,0375 % (p/v), glicina 39 mM y metanol 40% (v/v). La eficiencia de la transferencia se determinaba por la aparición en la membrana de las bandas del patrón preteñido utilizado y por tinción del gel con azul de Coomassie una vez transferido para comprobar la desaparición de las proteínas.

La inmunodetección de la proteína NtcA se llevaba a cabo con anticuerpos policlonales generados en conejos frente a NtcA recombinante (Muro-Pastor *et al.*, 1999). Tras la transferencia, la membrana se incubaba durante 2 h con disolución de bloqueo, que contenía leche en polvo 5% en tampón TBS (Tris-HCl 15 mM [pH 7,5], NaCl 200 mM) suplementado con Tween-20 0,05% (v/v). A continuación, la membrana se incubaba con el antisuero 0,1 % (v/v) diluido en la misma disolución de bloqueo, durante 15 h a 4°C con agitación suave. Tras esto, la membrana se sometía al lavado, a temperatura ambiente, con tampón TBS suplementado con Tween-20 0,05 % (v/v) durante cuatro períodos de 15 min. Una vez lavada, la membrana se incubaba durante 2 h a 4°C con una disolución que contenía anticuerpos (inmunoglobulina G) de cabra anti-inmunoglobulina G de conejo conjugados con peroxidasa (Sigma) diluidos 1:1.000 en disolución de bloqueo. Seguidamente se procedía al lavado de la membrana con tampón TBS suplementado con Tween-20 0,05 % (v/v) durante cuatro períodos de 15 min y un último lavado de 15 min con tampón TBS.

El proceso de revelado de la actividad peroxidasa se llevó a cabo mediante el sistema comercial “ECL-Plus” (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **2.4.9. HUELLA PEPTÍDICA**

Las proteínas extraídas de geles de poliacrilamida se identificaron en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) mediante digestión con tripsina y posterior análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF ("Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry")

### **2.5. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DNA-PROTEÍNA**

#### **2.5.1. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL**

Para el análisis de la interacción de la proteína NtcA con fragmentos de DNA se llevaban a cabo ensayos radiactivos de retardo en gel. Se utilizaba la proteína NtcA recombinante de *Anabaena* sp. PCC 7120, codificada en el plásmido pCSAM61, purificada según se describe en el apartado 2.4.4.1. Los fragmentos de DNA usados se obtenían mediante restricción y se marcaban con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (apartado 2.2.9.5B) o mediante PCR y se marcaban con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]dATP (apartado 2.2.9.5C). La incubación de la proteína y del DNA se llevaba a cabo en un volumen final de 15  $\mu$ l en una mezcla que contenía 1,5  $\mu$ l de tampón de unión 10x (HEPES-NaOH 120 mM [pH 8], Tris-HCl 40 mM [pH 8], KCl 600 mM, EDTA 1 mM, DTT 1M), seroalbúmina bovina 0,05  $\mu$ g· $\mu$ l $^{-1}$ , glicerol 8 % (v/v), poly (dI-dC) 0,05  $\mu$ g· $\mu$ l $^{-1}$ , el fragmento de DNA marcado y una cantidad variable de proteína NtcA purificada en un volumen final de 6  $\mu$ l de tampón de diálisis (apartado 2.4.4). Tras incubar la mezcla durante 30 min a 25°C, se le añadía 1,5  $\mu$ l de tampón de carga (apartado 2.2.4) y se visualizaba en un gel de acrilamida 6% (p/v) (acrilamida:bis-acrilamida, 30:0,38) preparado en tampón Tris-glicina con glicerol 7% (v/v). El tampón Tris-glicina (pH 8,5) utilizado en la preparación de los geles y como tampón de electroforesis contenía Tris-HCl 50 mM, glicina 380 mM y EDTA 13 mM. Antes de cargar las muestras, los geles se sometían a una corriente eléctrica de 100 V durante 1 h y, una vez cargadas, de 35 mA/gel. Para visualizar las bandas de DNA se utilizaba el sistema "Cyclone storage phosphor system" y el programa de análisis de imágenes "Optiquant" (Packard).

En los ensayos realizados para ver el efecto del 2-OG sobre la afinidad de la proteína al fragmento de DNA, se utilizaba la proteína NtcA recombinante con cola de histidinas (apartado 2.4.4.2) y el ensayo se realizaba en presencia de 2-OG 0,6 mM.

### 2.5.2. ENSAYOS DE PROTECCIÓN FRENTE A LA DEGRADACIÓN POR DNasa I

Los fragmentos de DNA de interés se obtenían mediante PCR utilizando un oligonucleótido marcado radiativamente con la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 (apartado 2.2.9.5C). El producto de PCR se sometía a extracción con un volumen de fenol:cloroformo (1:1, [v/v]), separándose las fases mediante centrifugación (2 min a 13.000 rpm). El DNA se precipitaba en nitrógeno líquido tras la adición de acetato amónico 2,5 M (pH 7,5), glucógeno 0,01  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Tras centrifugar la muestra (15 min a 13.000 rpm), el precipitado resultante se lavaba con etanol al 70% (v/v), se secaba al aire y se resuspendía en 50  $\mu\text{l}$  de agua desionizada de alta calidad.

El ensayo de unión de la proteína NtcA (obtenida según se describe en el apartado 2.4.4.1) al fragmento de DNA se llevaba a cabo durante 30 min a 32°C en un volumen final de 70  $\mu\text{l}$ . La mezcla de reacción contenía el tampón de unión (Tris-HCl 10 mM [pH 8], KCl 30 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, DTT 2 mM), poly(dI-dC) 0,03  $\mu\text{g}/\text{ensayo}$ , seroalbúmina bovina 0,05  $\mu\text{g}/\text{ensayo}$ , Tris-HCl 20 mM (pH 8), KCl 50 mM, glicerol 20% y proteína NtcA en un volumen final de 4  $\mu\text{l}$  diluida en tampón Tris-HCl 40 mM (pH 8). Tras el ensayo se procedió al tratamiento con 1 U de DNasa I (Roche) en presencia de acetato sódico 60 mM (pH 5,2) y  $\text{MgSO}_4$  8,25 mM durante 1 s a 32°C. La actuación de la DNasa se detenía a 4°C añadiendo 3,8 volúmenes de una solución que contenía EDTA 0,5 mM, SDS 0,125% (v/v) y acetato amónico 12,5 mM (pH 7,5). Se realizaba una extracción con 400  $\mu\text{l}$  de fenol:cloroformo (1:1 [v/v]) separándose las fases mediante centrifugación (2 min a 13.000 rpm). El DNA se precipitaba con 100  $\mu\text{g}$  de glucógeno y 1 ml de etanol absoluto frío en nitrógeno líquido. La muestra se centrifugaba 15 min a 13.000 rpm y el precipitado obtenido se lavaba con etanol 70%, se secaba al aire y se resuspendía en 3  $\mu\text{l}$  de tampón de carga con formamida (formamida 97,5% [v/v], xileno cianol FF 0,3% [p/v], azul de bromofenol 0,3% [p/v] y EDTA 10 mM [pH 8]) y se resolvía en un gel de urea-poliacrilamida al 6% de acrilamida (apartado 2.2.8). Como marcador de tamaño se cargaba una reacción de secuenciación llevada a cabo con el fragmento de DNA correspondiente y el oligonucleótido utilizado para la amplificación del fragmento, pero sin marcar en su extremo 5' (apartado 2.2.8).

## 2.6. ENSAYO DE ACTIVIDAD NITROGENASA

Para la determinación *in vivo* de la actividad nitrogenasa de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de las estirpes CSEL1 y CSEL2 (Tabla 2.2) se utilizó el método de reducción de acetileno descrito por Stewart *et al.* (1967). Este método se basa en la estimación de la actividad de la enzima a partir de la tasa de producción de etileno a partir de acetileno catalizada por el complejo enzimático de la

nitrogenasa. El análisis se llevaba a cabo con filamentos cultivados con amonio e incubados 20-24 h en deficiencia de nitrógeno combinado. Se disponían 2 ml de suspensión celular en matraces Erlenmeyer de 17 ml de capacidad que se cerraban con un tapón de goma y en los que se inyectaban 2 ml de acetileno, resultando una atmósfera con un 13,3% (v/v) de acetileno en aire. Después se incubaba a 30°C con luz y agitación según se describe en el apartado 2.1.1.2. Finalmente, se determinaba mediante cromatografía de gases la aparición de etileno en la fase gaseosa durante la incubación. Para ello, se tomaban varias muestras de 1 ml de la fase gaseosa entre los 20 y los 60 min de incubación con el acetileno. Como patrón se utilizaba una recta de calibrado elaborada con cantidades conocidas de etileno. La actividad se presenta como nmol de etileno producido·h<sup>-1</sup>·mg Chl<sup>-1</sup>.

## **2.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA**

El contenido de clorofila a (Chl) de las suspensiones celulares se determinaba espectrofotométricamente en extractos metanólicos (Mackinney, 1941). Las células contenidas en 1 ml de cultivo se recogían por centrifugación. El sedimento se mezclaba con 1 ml de metanol en un tubo de microcentrífuga y, tras agitación vigorosa durante 1 min, la suspensión resultante se centrifugaba a 13.000 rpm durante 2 min. La concentración de Chl en el sobrenadante se estimaba en base a su absorbancia a 665 nm, utilizándose un coeficiente de extinción  $\epsilon=74,46 \text{ (mg/ml)}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . La cantidad de células que contiene 1 µg de Chl contiene aproximadamente 25-30 µg de proteína.

## **2.8. MÉTODOS GENÉTICOS**

### **2.8.1. TRANSFERENCIA DE DNA A *E. coli* MEDIANTE TRANSFORMACIÓN**

Las células transformables preparadas según el método Hanahan (Hanahan, 1983) eran proporcionadas por el Servicio de Cultivos Biológicos del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (CICIC). Para la transformación, se mezclaban 0,1 ml de suspensión de células transformables, previamente descongeladas en hielo, con 10 µl de la preparación de DNA transformante. La mezcla se incubaba en hielo durante 15 min, tras lo cual se sometía a un choque térmico mediante incubación a 42°C durante 90 s. Después se mantenía 7 min en hielo, se añadía 1 ml de LB y se incubaba durante 1 h a 37°C. Por último, las células se sembraban en cajas de Petri que contenían medio LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados.

Para identificar mediante ensayos de "complementación α" transformantes que habían incorporado un plásmido con inserto, el medio sólido se suplementaba con X-Gal 40 µg·ml<sup>-1</sup>

(Sambrook y Russell, 2001). Las colonias portadoras de plásmido con inserto eran de color blanco, mientras que las que habían recibido plásmido sin inserto eran de color azul.

## 2.8.2. TRANSFERENCIA DE DNA A *Anabaena* sp. MEDIANTE CONJUGACIÓN

La transferencia de DNA a *Anabaena* sp. se realizaba, según se describe en Elhai y Wolk (1988a), mediante conjugación con una estirpe de *E. coli* que contenía el plásmido a transferir además del plásmido auxiliar pRL623 (Tabla 2.4). El plásmido pRL623 contiene genes que determinan metilasas de los sitios de restricción Ava I, Ava II y Ava III (Elhai *et al.*, 1997). Las metilaciones catalizadas por estas enzimas protegen al plásmido a transferir frente a las endonucleasas de restricción de la cianobacteria receptora. Los plásmidos eran movilizados mediante el plásmido conjugativo pRL443 (Tabla 2.4) (Elhai y Wolk, 1988a) aportado por una segunda estirpe de *E. coli*. La conjugación se realizaba según el siguiente procedimiento: alícuotas de 0,25 ml de cultivos en fase estacionaria de *E. coli* ED8654 (pRL443) y *E. coli* HB101 (pCSX, pRL623), donde pCSX era el plásmido a transferir, se utilizaban para inocular nuevos cultivos de 10 ml de medio LB suplementado con los antibióticos adecuados. Después de incubar a 37°C con agitación durante 2,5 h, las células, en fase exponencial de crecimiento, se recogían mediante centrifugación, se lavaban dos veces con 10 ml de LB, y se mezclaban en un volumen de 200-300 µl incubándolas a temperatura ambiente sin agitación durante 2 h. A continuación, se mezclaban con una suspensión celular de *Anabaena* sp. que contenía 10 µg de Chl (en un volumen de 200-300 µl), y la mezcla se extendía sobre un filtro de nitrocelulosa (Nucleopore, REC-85) dispuesto en una caja con medio de cultivo permisivo de cianobacterias suplementado con LB al 5% (v/v). Las cajas se incubaban a 30°C con baja intensidad de luz durante 6 h y posteriormente en condiciones habituales de cultivo durante 18 h. A continuación, los filtros se transferían a cajas con medio permisivo sin LB, que se incubaban 24 h en condiciones de cultivo, tras lo cual se pasaban a medio selectivo con antibióticos. Las colonias resistentes aparecían en este último medio tras 10-15 días de incubación.

## 2.9. MICROSCOPIA CONFOCAL LÁSER PARA LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA TESTIGO GFP

En este trabajo se ha utilizado la proteína GFPmut2, una versión modificada de la proteína fluorescente verde que presenta el pico de excitación a 481 nm y el de emisión a 507 nm (Cormack *et al.*, 1996). La acumulación de la proteína testigo GFP se analizaba mediante microscopía confocal láser. Las muestras se visualizaban con un objetivo de inmersión en aceite HCX PLAN-APO 63X 1.4 NA, que estaba conectado a un microscopio confocal láser “Leica TCS SP2” (Leica, Wetzlar,

Alemania). La proteína GFP se excitaba con una longitud de onda de 488 nm proporcionada por un láser de argón. La fluorescencia emitida por las estirpes derivadas de *Anabaena* sp. se analizaba utilizando ventanas de 500-570 nm, correspondiente a la fluorescencia de la GFP, y de 630-700 nm, correspondiente a la autofluorescencia de las cianobacterias. Todas las imágenes de un experimento se adquirirían con los mismos parámetros, de forma que se podía establecer una comparación de la fluorescencia en las mismas.

## **2.10. TINCIÓN DE PROHETEROCISTOS Y HETEROCISTOS CON AZUL ALCIAN**

El azul Alcian ("Alcian blue 8GX", Sigma) tiñe los polisacáridos de la envuelta de los proheterocistos y heterocistos. Para visualizarlos en el microscopio óptico, la muestra se preparaba mezclando en una proporción 1:1 (v/v) la suspensión de las cianobacterias y una disolución de azul Alcian al 1% en agua (p/v).

## **2.11. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE DNA Y PROTEÍNAS**

Para la búsqueda de pautas abiertas de lectura (ORFs), localización de sitios de restricción y traducción de secuencias nucleotídicas a secuencias de aminoácidos, se utilizaba el programa DNA-Strider diseñado por C. Mark (Service de Biochimie, Centre d'Études Nucléaires de Saclay, Francia). Para el diseño de los desoxioligonucleótidos a utilizar como cebadores en reacciones de PCR se empleaba el programa Amplify diseñado por B. Engels (Genetics Department, University of Wisconsin, EE.UU.).

La secuencia del genoma completo de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Kaneko *et al.*, 2001) está disponible en "Cyanobase" (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/>). Las secuencias de proteínas se analizaban mediante la aplicación BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Se utilizaba el programa CLUSTALW2 (Chenna *et al.*, 2003) proporcionado por el European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) para el alineamiento de secuencias de DNA. La predicción informática de la posible localización subcelular de las proteínas se analizó utilizando los programas PSORT (<http://www.psort.org/>), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), TopPred (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>) y HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>), combinados con el análisis de posibles péptidos señal mediante los programas SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), LipoP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) y TatP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>). Para cada proteína analizada se propone la localización más consistente con los resultados obtenidos mediante los diferentes programas.

### **3. RESULTADOS**





### 3. RESULTADOS

#### 3.1. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE *NtcA* y *HetR* EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL DESARROLLO DE HETEROCISTOS

El proceso de diferenciación de los heterocistos requiere el producto del gen regulador *hetR*, cuya expresión se induce tras detectar la célula la carencia de nitrógeno combinado en el medio (Buikema y Haselkorn, 1991b; Black *et al.*, 1993). Esta inducción de la expresión de *hetR* no tiene lugar en un mutante *ntcA* (Frías *et al.*, 1994; Muro-Pastor *et al.*, 2002). La proteína *NtcA* se requiere para el inicio del proceso de diferenciación (Frías *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994) y en el funcionamiento del heterocisto maduro (Herrero *et al.*, 2001 y 2004). Durante el desarrollo de los heterocistos, *ntcA* se induce transitoriamente de forma dependiente de *HetR*. Por lo tanto, en el contexto de la diferenciación del heterocisto, la expresión de los genes *ntcA* y *hetR* muestra una dependencia mutua (Muro-Pastor *et al.*, 2002).

El proceso de diferenciación implica la activación secuencial de múltiples genes relacionados específicamente con aspectos reguladores, estructurales o enzimáticos del desarrollo y funcionamiento del heterocisto (Golden y Yoon, 2003; Wolk, 2000). La expresión de algunos de estos genes u operones es dependiente de *NtcA* y *HetR*. Nos planteamos que la dependencia por *HetR* podría ejercerse a través de *NtcA*, es decir, que *HetR* fuera sólo necesario para inducir el incremento transitorio de *ntcA* durante el proceso de diferenciación, siendo *NtcA* la que determinara la regulación de los genes del desarrollo.

Para ensayar esta hipótesis y poder definir la relación de *NtcA* y *HetR* en el contexto del desarrollo de los heterocistos, se construyeron unas estirpes derivadas de *Anabaena* sp. PCC 7120 que exhibían un elevado nivel de la proteína *NtcA* independientemente de la fuente nitrogenada. Utilizando estas estirpes se analizó el efecto de la sobreexpresión de *NtcA* sobre la regulación de la expresión de distintos genes u operones implicados en la diferenciación de heterocistos, tanto en fondo genético silvestre como en un fondo mutante *hetR*.

##### 3.1.1. CONSTRUCCIÓN DE LAS ESTIRPES DERIVADAS DE *Anabaena* sp. PCC 7120 QUE SOBREENPRESAN *ntcA*

Para la obtención de un nivel elevado de la proteína *NtcA* de forma independiente de la fuente nitrogenada, se prepararon estirpes en las que la expresión del gen *ntcA* estuviera bajo la dirección del promotor *trc*, promotor de expresión elevada inducible por IPTG, que es un híbrido de los promotores *trp* y *lacUV5* (Amann *et al.*, 1988). En la Figura 3.1 se describe la construcción del

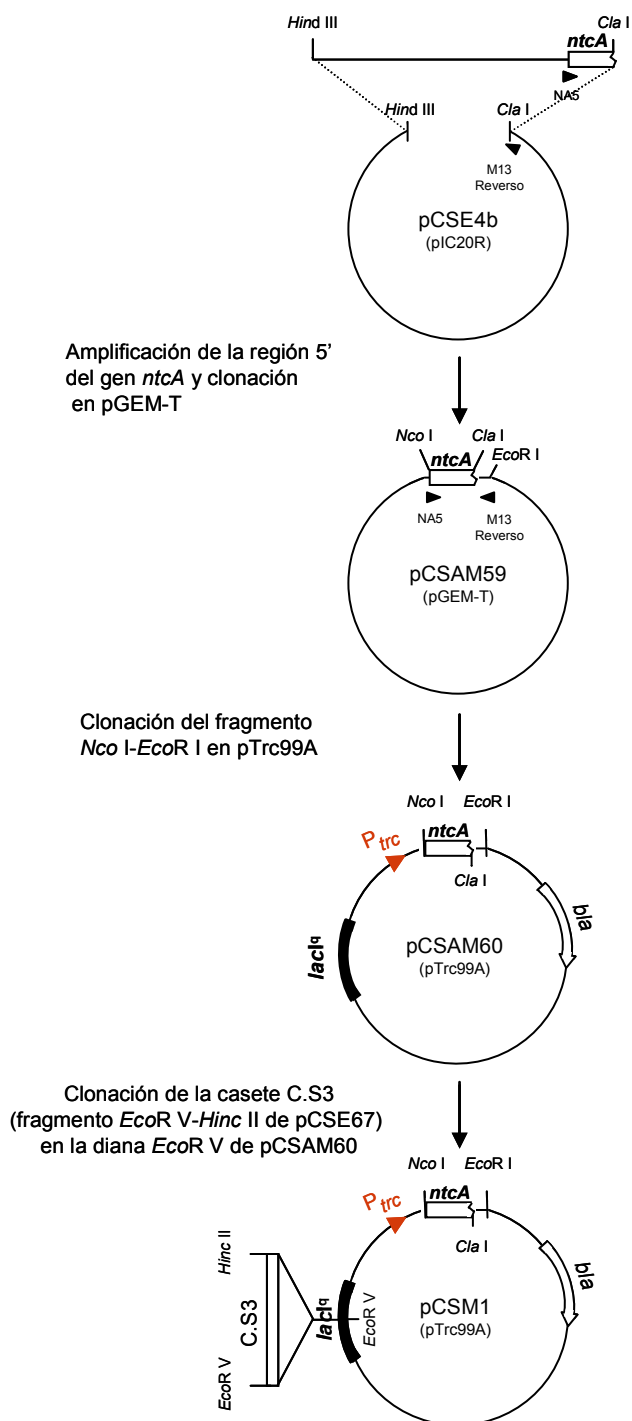
plásmido pCSM1 (Tabla 2.4), derivado del vector de expresión pTrc99A, que contenía la primera mitad del gen *ntcA* clonada detrás del promotor *trc*, quedando bajo la dirección de éste. La primera mitad del gen *ntcA* (~ 350 pb) se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos NA5 (que introduce una diana *Nco* I en el extremo 5' del gen) y M13-Reverso (Tabla 2.7a) y el plásmido pCSE4b como molde (Tabla 2.4), y se clonó en el vector pGEM-T dando lugar a pCSAM59. El fragmento *Nco* I-*Eco*R I de pCSAM59, que contiene desde el codón de inicio de la traducción hasta la diana *Cla* I del gen *ntcA* (323 pb de la región codificante), se clonó detrás del promotor *trc* en el vector de expresión pTrc99A digerido con *Nco* I y *Eco*R I obteniéndose el plásmido pCSAM60. Para permitir la selección de la integración de pCSAM60 en el cromosoma de *Anabaena* (Fig. 3.2), se introdujo una casete de resistencia a Sm y Sp (C.S3; Elhai y Wolk, 1988b) (fragmento *Eco*R V-*Hinc* II de pCSE67, Tabla 2.4) en la diana *Eco*R V localizada dentro del gen *lacI*<sup>q</sup>, dando lugar a pCSM1. Debido a que la expresión de *ntcA* desde el promotor *trc* en pCSM1 es deletérea para *E. coli*, el plásmido pCSM1 se mantuvo en la estirpe BL21(DE3) de *E. coli* (Tabla 2.3) en presencia de pREP4 (Quiagen, Tabla 2.4), el cual determina elevados niveles de expresión del gen del represor LacI<sup>q</sup>.

El plásmido pCSM1 se introdujo en *Anabaena* sp. PCC 7120 y en la estirpe derivada 216 (mutante puntual *hetR*; Tabla 2.1) mediante conjugación según se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.8.2). La integración de pCSM1 por recombinación homóloga en el cromosoma de *Anabaena* se seleccionó en medio BG11 suplementado con 5 µg·ml<sup>-1</sup> de Sm y 5 µg·ml<sup>-1</sup> de Sp. En las estirpes obtenidas, CSEL1 [*ntcA*(Con)] y CSEL2 [*ntcA*(Con) *hetR*] la integración de pCSM1 produce la duplicación parcial de la región genómica de *ntcA*, quedando una copia silvestre del gen *ntcA* bajo el control del promotor *trc*, mientras que una versión truncada del gen queda bajo la dirección del propio promotor de *ntcA* (Fig. 3.2A). La estructura genómica de las estirpes CSEL1 y CSEL2 se estudió mediante análisis de Southern (Fig. 3.2B) según se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.3.4).

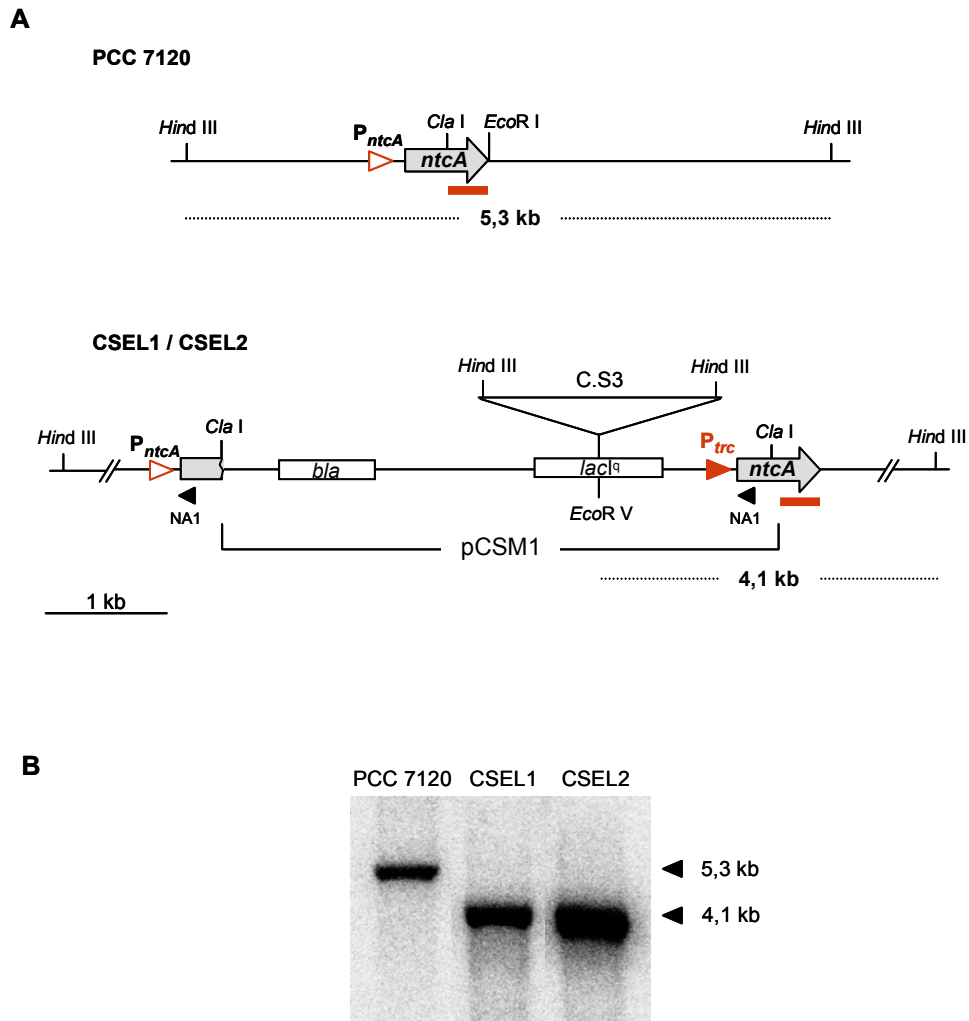
### 3.1.2. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *ntcA* EN LAS ESTIRPES CSEL1 Y CSEL2

#### 3.1.2.1. Niveles de transcrito *ntcA* y determinación del extremo 5' de los transcritos

Se llevó a cabo la determinación de los niveles de transcrito *ntcA* en las estirpes CSEL1 y CSEL2 mediante análisis de northern con RNA aislado de filamentos creciendo con amonio o incubados 9 ó 24 h sin nitrógeno combinado tras crecer con amonio (Fig. 3.3A). En el estudio se incluyeron las estirpes parentales PCC 7120 (silvestre) y 216 (*hetR*) como referencia. Se utilizó como sonda un fragmento correspondiente a la segunda mitad del gen, el mismo que para el análisis de Southern (Fig. 3.2A), de forma que sólo se detectara la expresión del gen *ntcA* completo (parte derecha de la duplicación). Como se había descrito en Muro-Pastor *et al.* (2002), en la estirpe



**Figura 3.1. Representación esquemática de la construcción de pCSM1** (ver texto). La región promotora de *trc* se indica como *P<sub>trc</sub>* (triángulo rojo). Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos negros) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.



**Figura 3.2. Análisis de la estructura genómica de la región *ntcA* en las estirpes CSEL1 y CSEL2.** (A) Esquema de la región cromosómica de *ntcA* en la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 y las estirpes derivadas CSEL1 y CSEL2. Las secuencias correspondientes a *ntcA* se señalan en gris. Se indica el plásmido pCSM1 integrado por recombinación homóloga en el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120, el fragmento correspondiente a la sonda utilizada en el análisis de Southern (barra roja), la posición del oligonucleótido NA1 utilizado en el experimento de extensión de cebador (Fig. 3.3C) y las dianas de restricción relevantes.  $P_{ntcA}$  (triángulo rojo hueco), promotor de *ntcA*;  $P_{trc}$  (triángulo rojo), promotor *trc*. (B) Análisis de Southern de la estructura genómica y segregación de los exconjugantes CSEL1 y CSEL2. El DNA genómico se digirió con *Hind* III y como sonda se utilizó un fragmento de 338 pb, correspondiente a la segunda mitad del gen *ntcA* (ver A), obtenido por restricción *Cla* I-*Eco*R I del plásmido pCSAM61 (Tabla 2.4). A la derecha de la imagen se indica el tamaño de las bandas esperadas, 5,3 kb en la estirpe silvestre y 4,1 kb en las estirpes mutantes, que se señalan con línea discontinua en el panel A.

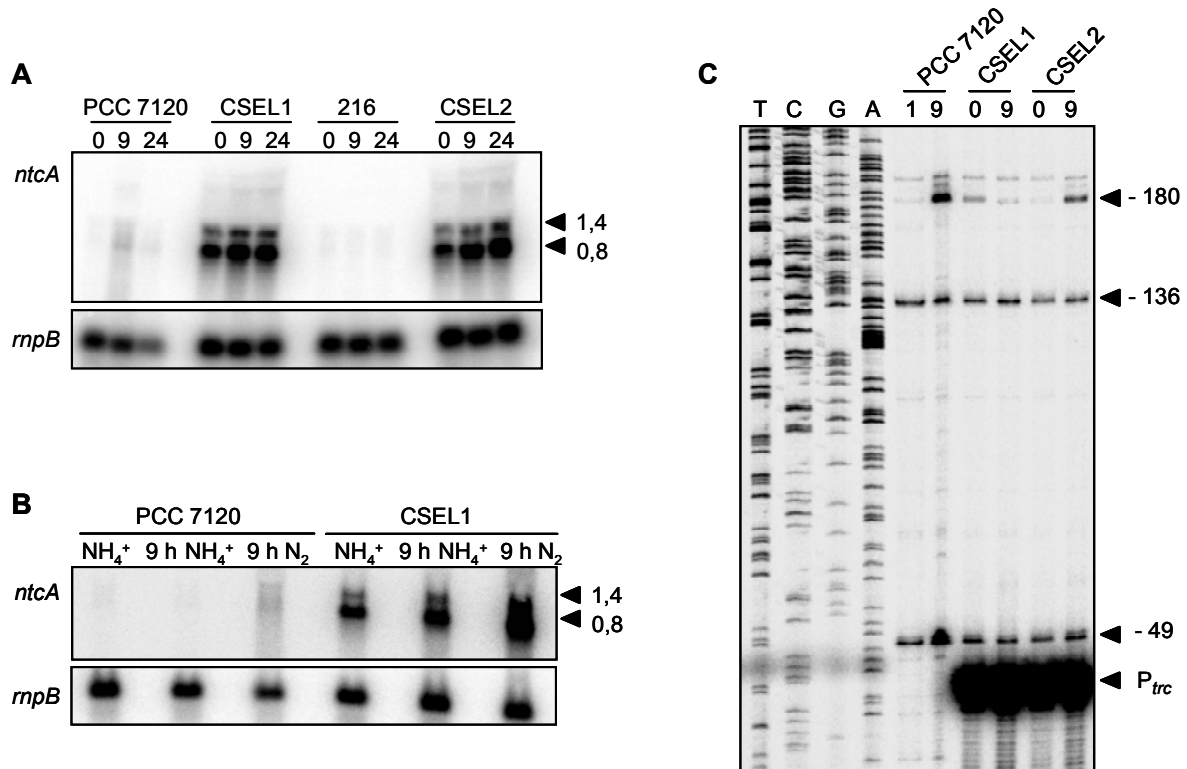
silvestre se observó un incremento de expresión de *ntcA* tras incubar los filamentos durante 9 h en deficiencia de nitrógeno, mientras que esta inducción transitoria no tenía lugar en la estirpe 216. La cantidad de transcrito *ntcA* en CSEL1 y CSEL2, tanto en medio con amonio como en ausencia de nitrógeno combinado, era más elevada que la observada en la estirpe silvestre durante el proceso de diferenciación. La cuantificación de la señal de *ntcA*, normalizada con respecto a la señal radiactiva de *rnpB* (apartado 2.3.4.2, Materiales y Métodos), indicó que el nivel de transcrito *ntcA* en filamentos creciendo con amonio era unas 50 veces mayor en las estirpes CSEL1 y CSEL2 que en la estirpe silvestre. Al igual que en la estirpe PCC 7120 (Wei *et al.*, 1994), se observaron dos transcritos de tamaño 0,8 kb y 1,4 kb.

Aunque la expresión desde el promotor *trc* no está sujeta a regulación por nitrógeno, en las estirpes CSEL1 y CSEL2 la cantidad de transcrito era superior en condiciones de ausencia de nitrógeno combinado que con amonio, lo que sugiere la posible existencia de otro(s) factor(es) implicado(s) en la determinación del nivel de transcrito *ntcA* aparte de la regulación a nivel de inicio de la transcripción. Dado que en los experimentos de inducción (apartado 2.1.1.4, Materiales y Métodos) la muestra correspondiente al tiempo 0 h (filamentos creciendo con amonio) se recogía antes del lavado de las células y posterior reinóculo en medio fresco, se consideró la posibilidad de que el incremento de transcrito tras el paso de los filamentos a medio sin nitrógeno combinado se debiera a un posible efecto del lavado de las células o del reinóculo en medio fresco. Para comprobar esta hipótesis, se llevó a cabo un experimento de inducción con células cultivadas con amonio, y lavadas e incubadas 9 h con medio fresco conteniendo amonio o en ausencia de nitrógeno combinado (Fig. 3.3B). El nivel de transcrito en los filamentos incubados 9 h con amonio tras el lavado de las células fue similar al de los filamentos del cultivo establecido en amonio, descartándose un posible efecto del lavado de las células.

El extremo 5' de los transcritos de *ntcA* en las estirpes CSEL1 y CSEL2 se determinó mediante ensayos de extensión del cebador NA1 (Fig. 3.2A, Tabla 2.7a) con RNA aislado de filamentos creciendo con amonio o cultivados con amonio e incubados 1 ó 9 h en ausencia de nitrógeno combinado (Fig. 3.3C), según se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.3.5). En la estirpe silvestre (PCC 7120) se observaron los tres inicios de la transcripción (TSPs) descritos por Muro-Pastor *et al.* (2002) localizados en las posiciones -49, -136 y -180 respecto al sitio de inicio de la traducción de *ntcA*. En las estirpes CSEL1 y CSEL2, la expresión de *ntcA* tenía lugar principalmente desde el promotor *trc*, independientemente del estado nitrogenado de las células, y también se detectaron los TSPs del promotor silvestre de *ntcA* que corresponden a la expresión de la versión truncada del gen desde el promotor silvestre (Fig. 3.2). Dado que la expresión desde los TSPs -180 y -49 es dependiente de NtcA (Muro-Pastor *et al.*, 2002), su expresión podría estar

## Resultados

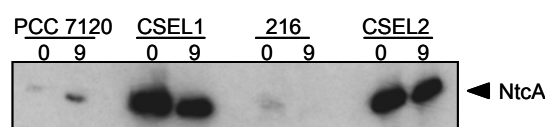
alterada en las estirpes CSEL1 y CSEL2 debido a los elevados niveles de proteína NtcA que presentaban (siguiente apartado).



**Figura 3.3. Expresión de *ntcA* en las estirpes CSEL1 y CSEL2.** Se llevó a cabo el estudio de la expresión de *ntcA* mediante análisis de northern, con 50 µg de RNA aislado de filamentos creciendo con amonio (0 h) y lavados e incubados 9 ó 24 h en ausencia de nitrógeno combinado (A), o con 25 µg de RNA aislado de filamentos creciendo con amonio (0 h) y lavados e incubados 9 h con amonio (9 h NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ó 9 h en ausencia de nitrógeno combinado (9 h N<sub>2</sub>) (B). Se usó como sonda el mismo fragmento utilizado en el análisis de Southern (ver Fig. 3.2). Como control de carga y transferencia se hibridó con el gen *rnpB* de *Anabaena* sp. PCC 7120. (C) Determinación del extremo 5' de los transcritos *ntcA* mediante ensayos de extensión del cebador NA1 (ver Fig. 3.2) utilizando 25 µg de RNA (estirpe silvestre) ó 5 µg de RNA (estirpes CSEL1 y CSEL2). El RNA se aisló de filamentos creciendo con amonio (0 h) o filamentos cultivados con amonio e incubados en ausencia de nitrógeno combinado durante 1 ó 9 h. La reacción de secuenciación utilizada como escalera de tamaño se obtuvo con el plásmido pCSM1 y el oligonucleótido NA1. La posición de los extremos 5' respecto al codón ATG de *ntcA* originados desde el promotor de *ntcA* (TSP -49, -136 y -180) así como desde el promotor *trc* (P<sub>trc</sub>) se indican con flechas. Nótese que la cantidad de RNA de CSEL1 y CSEL2 utilizada en los ensayos fue 5 veces menor que en el caso de la estirpe silvestre.

### 3.1.2.2. Niveles de proteína NtcA en las estirpes CSEL1 y CSEL2

Se determinó la cantidad de proteína NtcA en las estirpes CSEL1 y CSEL2 mediante análisis de western, según se describe en el apartado 2.4.8 (Materiales y Métodos), llevado a cabo con extractos libres de células (apartado 2.4.1.1) de filamentos cultivados con amonio o incubados 9 h en ausencia de nitrógeno combinado y anticuerpos generados contra la proteína NtcA de *Anabaena* (Fig. 3.4). De acuerdo con lo observado a nivel de transcrito, en la estirpe silvestre la cantidad de proteína era superior en filamentos incubados sin nitrógeno combinado, incremento que no se observaba en la estirpe 216 (*hetR*). Las estirpes CSEL1 y CSEL2 contenían elevados niveles de NtcA independientemente del estado nitrogenado de los filamentos. El análisis de western con diluciones seriadas de estos extractos mostró que la cantidad de proteína NtcA en filamentos completos de CSEL1 y CSEL2 era al menos 25 veces mayor que la observada en la estirpe silvestre creciendo en presencia de amonio (no se muestra). Estos resultados indican que la cantidad de proteína NtcA en CSEL1 y CSEL2 es superior a la de PCC 7120 independientemente de la fuente nitrogenada y de la presencia de una proteína HetR funcional.



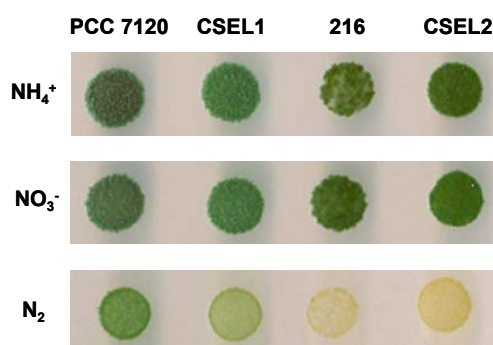
**Figura 3.4. Cantidad de proteína NtcA en *Anabaena* sp. PCC 7120 y en las estirpes 216 (*hetR*), CSEL1 y CSEL2.** Análisis de western con anticuerpos anti-NtcA y extracto libre de células de filamentos cultivados con amonio (0 h), o cultivados con amonio e incubados en ausencia de nitrógeno combinado durante 9 h. El extracto libre de células utilizado corresponde a una muestra de cultivo conteniendo 1,6 µg de clorofila. Se señala con un triángulo la proteína NtcA.

### 3.1.3. FENOTIPO DE LAS ESTIRPES QUE SOBREEXPRESAN *ntcA*: CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD NITROGENASA

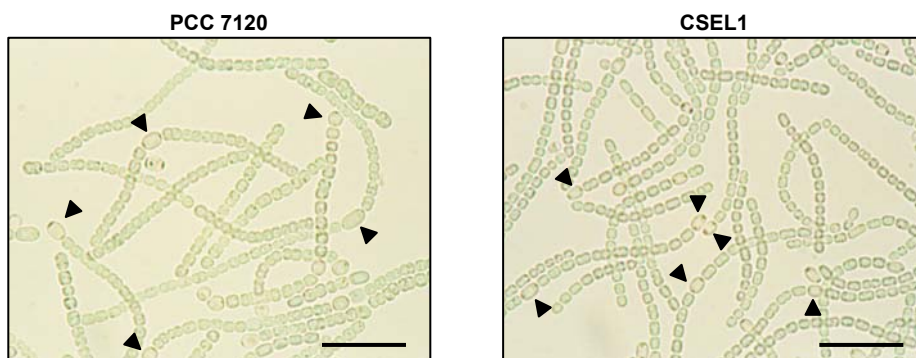
La expresión de *ntcA* desde el promotor *trc* provoca un incremento intracelular de la proteína reguladora NtcA de al menos 25 veces respecto a la estirpe silvestre (apartado anterior). Para determinar si el exceso de proteína producía algún efecto deletéreo en la célula se analizó la capacidad de crecimiento de las estirpes CSEL1 y CSEL2 a expensas de distintas fuentes nitrogenadas. Se estudió el crecimiento en medio sólido, incluyéndose las estirpes parentales, PCC 7120 y 216, como referencia (Fig. 3.5). El crecimiento de las estirpes CSEL1 y CSEL2 en medio con amonio o nitrato fue similar al de la estirpe silvestre; sin embargo, a expensas del nitrógeno atmosférico sólo crecía bien la estirpe silvestre PCC 7120. En condiciones de crecimiento

## Resultados

diazotrófico, la estirpe CSEL1 presentaba cierto crecimiento en medio sólido (Fig. 3.5), pero en medio líquido no se observaba incremento de biomasa (no se muestra). Se visualizaron al microscopio óptico filamentos cultivados con amonio e incubados durante 26 h en deficiencia de nitrógeno (Fig. 3.6) y se observó que *Anabaena* sp. PCC 7120 y la estirpe derivada CSEL1 presentaban una frecuencia de heterocistos similar (~ 6% de las células). Sin embargo, tras 5 días de incubación en ausencia de nitrógeno combinado en medio líquido, los filamentos de la estirpe CSEL1 exhibían muy pocos heterocistos maduros y ningún proheterocisto, según mostró la tinción con azul Alcian (Materiales y Métodos, apartado 2.10). En la estirpe 216 y su derivada CSEL2 no se observaron heterocistos ni proheterocistos en ningún caso. Cuando las células incubadas durante 5 días en medio sin nitrógeno combinado se inocularon en medio fresco con amonio o nitrato, se observó un crecimiento similar al de la estirpe silvestre en todos los casos. Sin embargo, cuando se volvieron a inocular en medio carente de nitrógeno combinado, no hubo crecimiento en las estirpes mutantes 216, CSEL1 y CSEL2.



**Figura 3.5. Análisis del crecimiento de las estirpes CSEL1 y CSEL2 en medio sólido con distintas fuentes de nitrógeno.** Se sembraron 10  $\mu$ l de suspensiones celulares conteniendo 0,05  $\mu$ g Chl·ml<sup>-1</sup> en medio sólido con amonio o nitrato como fuente de nitrógeno ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ), o sin nitrógeno combinado ( $\text{N}_2$ ). Las estirpes se incubaron a 30°C con luz durante 10 días. Las células procedían de cultivos líquidos conteniendo amonio y se lavaron con BG11<sub>0</sub>. Se utilizaron como control de crecimiento las estirpes parentales *Anabaena* sp. PCC 7120 y 216.



**Figura 3.6. Desarrollo de heterocistos en la estirpe CSEL1.** Fotografía al microscopio óptico de filamentos de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de la estirpe derivada CSEL1 cultivados con amonio e incubados sin nitrógeno combinado durante 26 h mostrando heterocistos (triángulos negros). Barra de escala, 20  $\mu$ m.



El proceso de desarrollo culmina con un heterocisto funcional, es decir, con capacidad de fijar dinitrógeno. Para determinar si los heterocistos desarrollados por la estirpe CSEL1 en condiciones de crecimiento diazotrófico eran funcionales, se midió la actividad nitrogenasa de filamentos incubados en ausencia de nitrógeno combinado durante 20 a 26 h según se describe en el apartado 2.6 (Materiales y Métodos). La visualización de los filamentos al microscopio óptico confirmó que la diferenciación de los heterocistos se había completado a nivel morfológico. La estirpe CSEL1 alcanzaba niveles de actividad ( $\sim 1 \mu\text{mol de etileno} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Chl}^{-1}$ ) similares a los de la estirpe silvestre, aunque el desarrollo de la misma en relación al proceso de diferenciación de los heterocistos estaba ligeramente retrasado (observación hecha en tres experimentos independientes).

En resumen, los resultados obtenidos indican que la sobreexpresión de *ntcA* en un fondo mutante *hetR* no promueve el desarrollo de heterocistos (estirpe CSEL2), mientras que en fondo silvestre (estirpe CSEL1) afecta de forma negativa al crecimiento a expensas de dinitrógeno, aunque permite, al menos, el desarrollo de una primera generación de heterocistos.

### 3.1.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL DESARROLLO DEL HETEROCISTO EN LAS ESTIRPES CSEL1 Y CSEL2

El proceso de diferenciación de los heterocistos en *Anabaena* sp. PCC 7120 implica un cambio significativo en la expresión génica (Fleming y Haselkorn, 1974; Lynn *et al.*, 1986; Ehira y Ohmori, 2006a). Se analizó el efecto de la sobreexpresión de *ntcA* en el fondo silvestre y en el fondo mutante *hetR* sobre la expresión de algunos de estos genes mediante análisis de northern (Fig. 3.7).

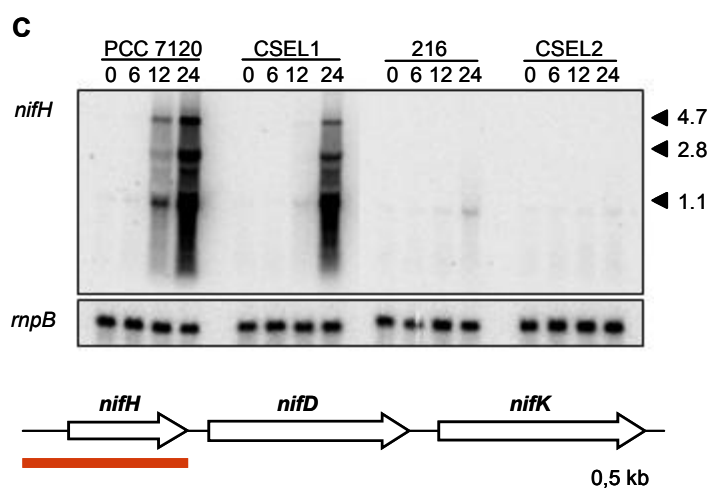
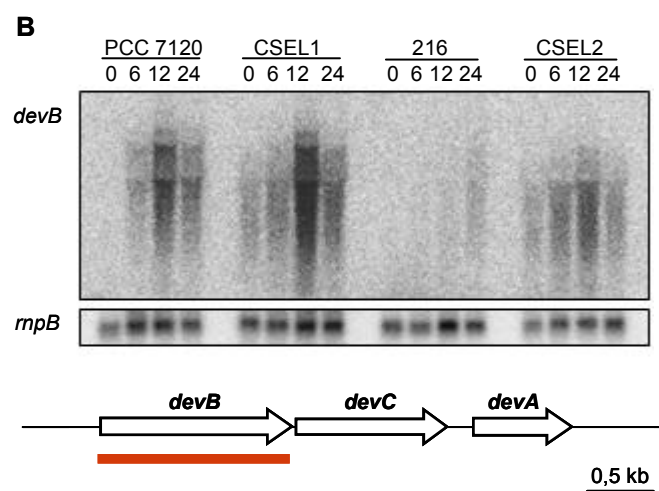
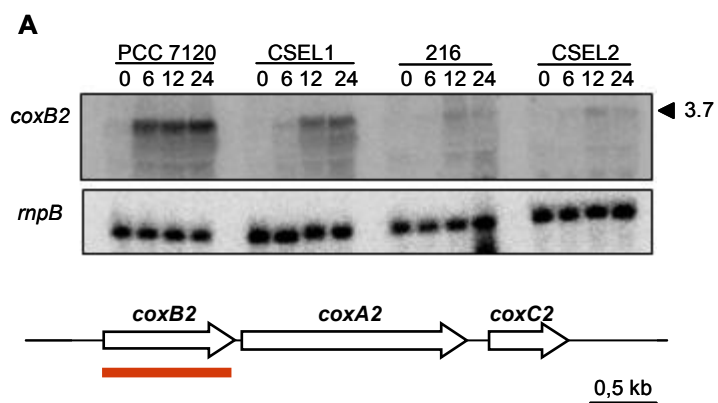
El operón *cox2* determina una citocromo *c* oxidasa específica de los heterocistos. Su expresión se induce en filamentos incubados sin nitrógeno combinado y es dependiente de NtcA y HetR, detectándose el transcrito *cox2* a las 6 h de inducción (Valladares *et al.*, 2003). En la estirpe silvestre, el nivel de transcrito *cox2* es  $\sim 7$  veces superior en filamentos incubados 24 h en ausencia de nitrógeno combinado que en medio con amonio (Fig. 3.7A; Valladares *et al.*, 2003). La inducción de la expresión fue menor ( $\sim 3,5$  veces a las 24 h en  $\text{N}_2$ ) y estaba retrasada en CSEL1. Los niveles de transcrito eran muy bajos en la estirpe 216 y en su derivado CSEL2 (Fig. 3.7A). Los resultados indican que HetR se requiere para la expresión del operón *cox2* independientemente de los niveles de NtcA.

El operón *devBCA* determina las subunidades de un exportador tipo ABC esencial para la formación de la capa laminada de la envuelta del heterocisto (Fiedler *et al.*, 1998). Se ha propuesto como exportador de los glicolípidos específicos de la capa laminada o de alguna enzima implicada

en el ensamblaje de la misma. Su expresión se induce durante el desarrollo de los heterocistos y depende de *HetR* (Cai y Wolk, 1997) y *NtcA* (Fiedler *et al.*, 2001). La inducción del operón *devBCA* en medio carente de nitrógeno combinado fue más elevada en CSEL1 que en la estirpe silvestre (Fig. 3.7B). A diferencia de lo observado en la estirpe 216, en la que la expresión de *devBCA* es muy débil (Fiedler *et al.*, 2001), en la estirpe derivada CSEL2 sí se observaba inducción. Hay que señalar que en las estirpes que sobreexpresan *ntcA* se detectaba el transcrito también en presencia de amonio. Estos resultados indican que *NtcA* regula positivamente la expresión de *devBCA* independientemente de *HetR*.

En *Anabaena* sp. PCC 7120 el operón *nifHDK*, que determina las subunidades de la enzima nitrogenasa, se expresa de forma localizada en los heterocistos (Elhai y Wolk, 1990) desde un promotor regulado por nitrógeno (Haselkorn *et al.*, 1983) que no se expresa en un mutante *ntcA* (Frias *et al.*, 1994; Valladares *et al.*, 1999) ni en un mutante *hetR* (Herrero *et al.*, 2004). En consonancia con lo observado para la actividad nitrogenasa (apartado anterior), los tres transcritos descritos para el operón *nifHDK* (*nifH*, 1,1 kb; *nifHD*, 2,8 kb; *nifHDK*, 4,7 kb) (Haselkorn *et al.*, 1986; Golden *et al.*, 1991) se detectaban antes en la estirpe silvestre que en CSEL1 (Fig. 3.7C). Aunque en las estirpes 216 y CSEL2 no se observó expresión del operón completo, sí se detectó el transcrito correspondiente a *nifH*. Los resultados obtenidos muestran el requerimiento de una proteína *HetR* funcional para la regulación positiva del operón *nifHDK*.

**Figura 3.7. Expresión de los operones *cox2*, *devBCA* y *nifHDK* en *Anabaena* sp. PCC 7120 y en las estirpes 216, CSEL1 y CSEL2.** Se llevó a cabo el análisis de northern con RNA aislado de filamentos creciendo con amonio (0 h), o de filamentos cultivados con amonio e incubados sin nitrógeno combinado 6, 12 ó 24 h. La cantidad de RNA utilizada en los filtros fue: 25 µg (B y C) y 40 µg (A). Los filtros se hibridaron con un fragmento de 996 pb de *coxB2* obtenido por PCR utilizando como molde el plásmido pCSAV128 y los oligonucleótidos CB2-4 y CB2-5 (A); con un fragmento de 1.423 pb de *devB* obtenido por PCR utilizando como molde el plásmido pIM11 y los oligonucleótidos O34 y O18 (B); o con un fragmento de 1.231 pb de *nifH* obtenido por PCR utilizando como molde el plásmido pCSAV60 y los oligonucleótidos NH1 y NH4 (C). Como control de carga y transferencia se hibridó con el gen *rnpB* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (hibridación inferior de cada panel; apartado 2.3.4.2). En cada caso se muestra un esquema de la región genómica analizada, y la barra roja corresponde a la sonda utilizada. A la derecha de la imagen se indica el tamaño en kb previamente descrito de algunos de los transcritos. Los plásmidos y oligonucleótidos utilizados se describen en Materiales y Métodos (Tablas 2.4 y 2.7a). Nota: la región *nifHDK* se muestra reordenada tras la escisión del elemento de 11 kb (ver más adelante).



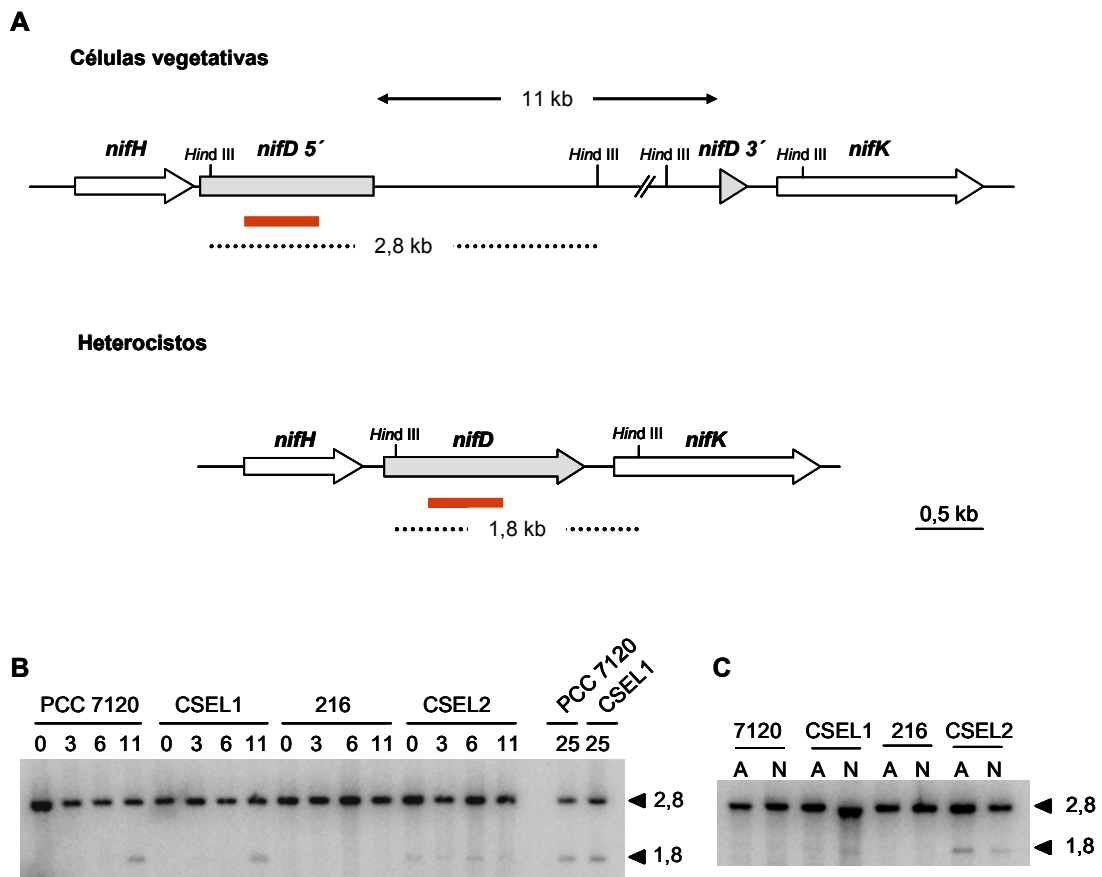
### 3.1.5. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE *ntcA* SOBRE LA REORDENACIÓN DE LOS OPERONES *nifHDK* Y *nifB-fdxN-nifS-nifU*

En *Anabaena* sp. PCC 7120, en una fase tardía del proceso de diferenciación de los heterocistos, tiene lugar la reordenación de dos regiones de DNA localizadas en los genes *nif* o genes relacionados con la fijación del nitrógeno atmosférico (Golden *et al.*, 1985; Haselkorn *et al.*, 1986) que resulta en la escisión, específicamente en los heterocistos, de dos fragmentos de DNA mediante recombinación específica de sitio (Golden *et al.*, 1985; 1987). Una de las reordenaciones implica un elemento de 11 kb que interrumpe el gen *nifD*, de forma que al escindirse se completa la secuencia codificante del gen permitiéndose la expresión del operón *nifHDK* (Fig. 3.8A). El otro elemento corresponde a un fragmento de 55 kb que interrumpe el gen *fdxN* que forma parte del operón *nifB-fdxN-nifS-nifU* (Fig. 3.9A) (Golden *et al.*, 1988a; Mulligan *et al.*, 1989).

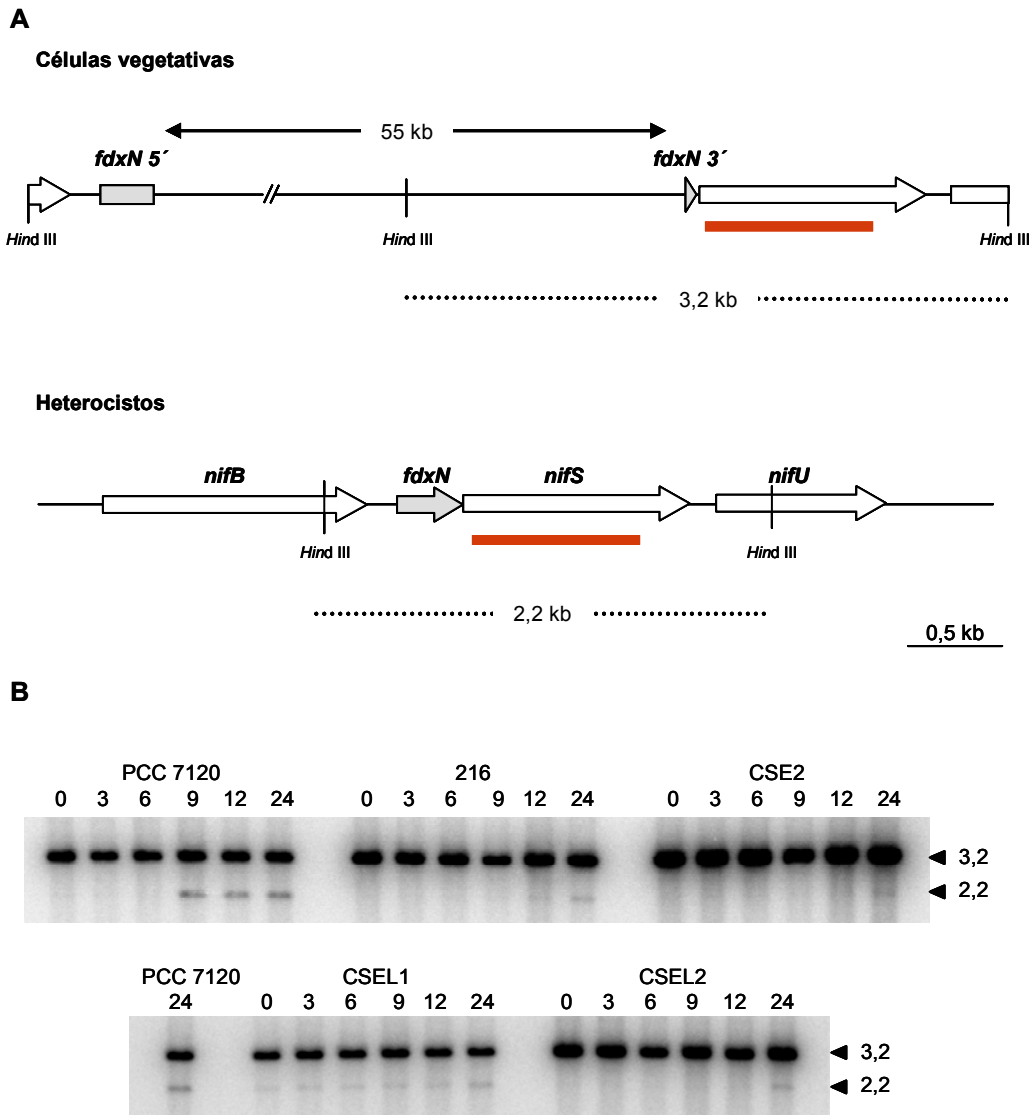
La reordenación de *nifD* está catalizada por la recombinasa específica de sitio XisA, cuyo gen está localizado en uno de los extremos del fragmento de 11 kb. La proteína NtcA se une, en condiciones de ensayo *in vitro*, a tres sitios en la región promotora de *xisA* (Chastain *et al.*, 1990; Ramasubramanian *et al.*, 1994) y se ha demostrado que el proceso de reordenación no tiene lugar en una estirpe mutante *ntcA* (Wei *et al.*, 1994). Se llevó a cabo el estudio de la escisión del elemento de 11 kb mediante análisis de Southern en las estirpes CSEL1 y CSEL2. Los resultados mostrados en la Figura 3.8B indican que el proceso también requiere una proteína HetR funcional, ya que no se observaba reordenación en la estirpe 216 (*hetR*). Se obtuvieron resultados similares con la estirpe DR884a (Tabla 2.1), mutante insercional de *hetR* (no se muestra). En el fondo silvestre, el elevado nivel de proteína NtcA (estirpe CSEL1) no alteraba la reordenación del fragmento de 11 kb; sin embargo, en el fondo mutante *hetR* (estirpe CSEL2), la reordenación tenía lugar incluso en presencia de amonio (Fig. 3.8B y 3.8C) o nitrato (Fig. 3.8C).

La escisión del elemento de 55 kb es independiente de la del elemento de 11 kb (Golden *et al.*, 1988). Requiere una proteína NtcA funcional, ya que en un mutante *ntcA* creciendo a expensas de nitrato o N<sub>2</sub> se detecta algo de banda reordenada pero sin alcanzar los niveles observados en la estirpe silvestre (Wei *et al.*, 1994). En la Figura 3.9 se muestra el análisis mediante Southern de la escisión del fragmento de 55 kb durante el proceso de diferenciación de heterocistos en la estirpe PCC 7120, donde se detectaba a las 9 h de incubación de los filamentos en medio sin nitrógeno combinado. En las estirpes CSE2 (*ntcA*) y 216 (*hetR*) se detectaba la banda reordenada a las 12 h (estirpe 216) o a las 24 h (estirpe CSE2). La sobreexpresión de *ntcA* en el fondo mutante *hetR* (CSEL2) no alteraba los resultados obtenidos en la estirpe parental (216); sin embargo, en un fondo silvestre (estirpe CSEL1), la sobreexpresión provocaba la escisión del elemento de 55 kb incluso en presencia de amonio (Fig. 3.9B). Los resultados obtenidos indican que las proteínas NtcA y HetR

afectan a la reordenación del elemento de *fdxN*, ya que la falta de las mismas retarda la aparición de banda reordenada en respuesta a la deficiencia de nitrógeno, y que elevados niveles de proteína NtcA, en presencia de proteína HetR, provocan la escisión del fragmento de 55 kb incluso en cultivos creciendo con amonio.



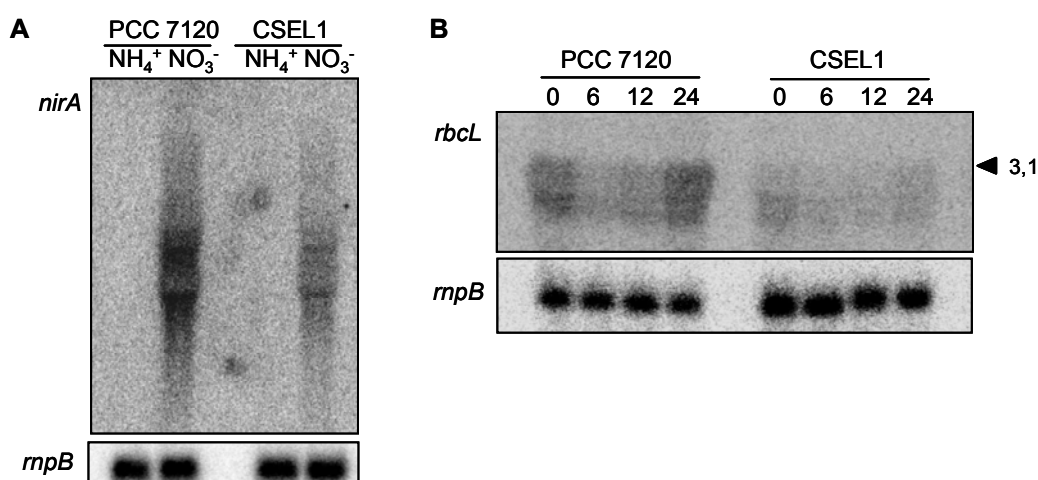
**Figura 3.8. Escisión del fragmento de 11 kb que interrumpe el gen *nifD* en *Anabaena* sp. PCC 7120 y en los estirpes 216, CSEL1 y CSEL2.** (A) Esquema de la región genómica del operón *nifHDK* en las células vegetativas y en los heterocistos maduros. Se señala en gris la secuencia correspondiente al gen *nifD* que está interrumpido por un fragmento de 11 kb en las células vegetativas. Se indican las dianas de restricción relevantes, la sonda utilizada en el análisis de Southern (barra roja) y, con línea discontinua, las bandas esperadas en el análisis de Southern, una de 2,8 kb en las células vegetativas y a otra de 1,8 kb en los heterocistos. (B) Estudio de la reordenación de la región *nifD* mediante análisis de Southern con DNA aislado de filamentos creciendo con amonio (0 h) o filamentos cultivados con amonio y sometidos a deficiencia de nitrógeno durante las horas indicadas en cada caso, y digerido con *Hind* III. (C) Estudio de la reordenación de la región *nifD* mediante análisis de Southern con DNA aislado de cultivos establecidos creciendo con amonio (A) o nitrato (N), y digerido con *Hind* III. Se utilizó como sonda un fragmento de 541 pb interno al gen *nifD* (barra roja, panel A) obtenido por PCR utilizando el plásmido pCSEL7 como molde (Tabla 2.5) y los oligonucleótidos ND1 y ND2 (Tabla 2.7a). A la derecha de la imagen se indica el tamaño en kb de las bandas esperadas (ver panel A).



**Figura 3.9. Escisión del fragmento de 55 kb que interrumpe el gen *fdxN* en *Anabaena* sp. PCC 7120 y en las estirpes 216, CSEL1 y CSEL2. (A) Esquema de la región genómica del operón *nifB-fdxN-nifS-nifU* en las células vegetativas y en los heterocistos maduros. Se señala en gris la secuencia correspondiente al gen *fdxN* que se encuentra interrumpido por un fragmento de 55 kb en las células vegetativas. Se indican las dianas de restricción relevantes, la sonda utilizada en el análisis de Southern (barra roja) y, con línea discontinua, las bandas esperadas en el análisis de Southern, de 3,2 kb en las células vegetativas y 2,2 kb en los heterocistos. (B) Estudio de la reordenación de la región *fdxN* mediante análisis de Southern con DNA aislado de filamentos creciendo con amonio (0 h) o filamentos cultivados con amonio y sometidos a deficiencia de nitrógeno durante las horas indicadas en cada caso, y digerido con *Hind* III. Se utilizó como sonda un fragmento de 897 pb del gen *nifS* obtenido por PCR utilizando DNA cromosómico como molde y los oligonucleótidos 55kb-1 y 55kb-2 (Tabla 2.7a). A la derecha de la imagen se indica el tamaño en kb de las bandas esperadas (ver panel A).**

### 3.1.6. EXPRESIÓN DE OTROS GENES REGULADOS POR NITRÓGENO EN LA ESTIRPE CSEL1

En *Anabaena* sp. PCC 7120, la asimilación de nitrato como fuente de nitrógeno alternativa al amonio está regulada por éste. Las células toman el nitrato del medio principalmente mediante un sistema de transporte activo (la permeasa de tipo ABC NtrABCD), y en el interior celular lo reducen a amonio mediante dos reacciones secuenciales catalizadas por la nitrato reductasa (NarB) y la nitrito reductasa (NirA) respectivamente. Los genes que determinan estas proteínas y enzimas de asimilación de nitrato se encuentran agrupados en un operón, denominado operón *nir*, que tiene la estructura 5'-*nirA-nrtABCD-narB* 3' (Frías *et al.*, 1997) y su expresión es dependiente de NtcA y de la presencia de nitrato en el medio (Frías *et al.*, 1994; 1997). En el análisis mediante northern de la expresión del operón *nir* en la estirpe CSEL1 (Fig. 3.10A) sólo se observaba transcrito en ausencia de amonio, al igual que sucede en la estirpe silvestre. Este resultado indica que los elevados niveles de NtcA no liberan la expresión del operón *nir* de la regulación por nitrógeno.



**Figura 3.10. Expresión de los operones *nir* y *rbcLXS* en *Anabaena* sp. PCC 7120 y la estirpe CSEL1.** (A) Estudio de la expresión del operón *nir* mediante análisis de northern con 30  $\mu\text{g}$  de RNA aislado de filamentos creciendo con amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y de filamentos cultivados con amonio e incubados durante 4 h en medio con nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Se utilizó como sonda un fragmento de 757 pb interno al gen *nirA* obtenido por PCR utilizando como molde el plásmido pCSE26 y como cebadores los oligonucleótidos Nir-15 y Nir-16 (Tablas 2.4 y 2.7a). (B) Análisis de la expresión del operón *rbcLXS* mediante northern con 40  $\mu\text{g}$  de RNA aislado de filamentos creciendo con amonio (0 h) y de filamentos cultivados con amonio e incubados durante 6, 12 ó 24 h en ausencia de nitrógeno combinado. Se utilizó como sonda un fragmento de 1.139 pb del gen *rbcL* obtenido por PCR utilizando como molde el plásmido pCSAV61 y como cebadores los oligonucleótidos RL3 y RL4 (Tablas 2.4 y 2.7a). A la derecha de la imagen se indica el tamaño en kb previamente descrito del transcrito *rbcLXS*. Como control de carga y transferencia se hibridó con el gen *mpB* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (apartado 2.3.4.2).

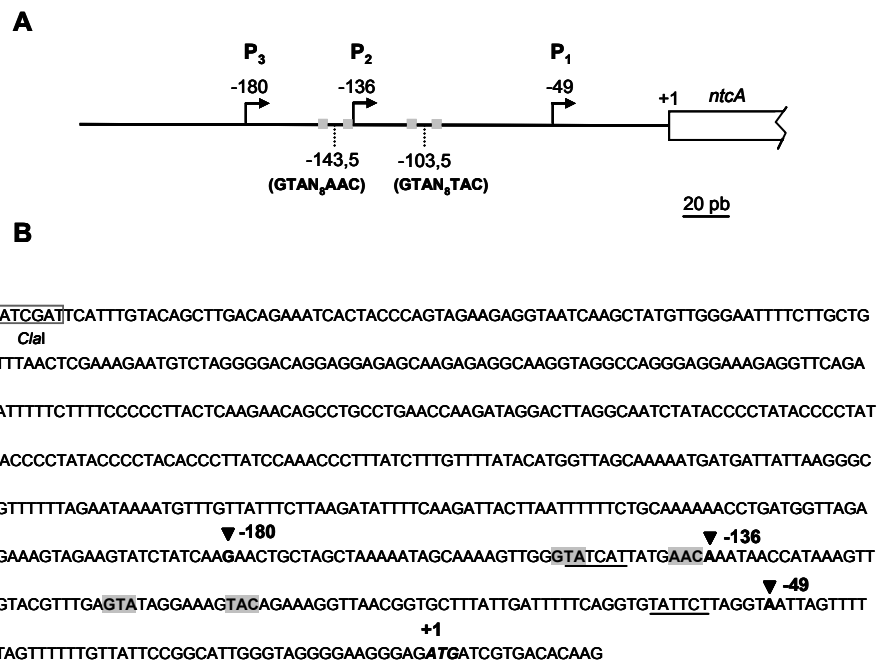
## Resultados

En condiciones de crecimiento diazotrófico, el operón *rbcLXS*, que determina la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), sólo se expresa en células vegetativas (Elhai y Wolk, 1990; Yoon y Golden, 1998). Mediante ensayos de retardo en gel y análisis de protección frente a degradación por DNasa I, Chastain *et al.* (1990) y Ramasubramanian *et al.* (1994) determinaron la existencia de dos posibles sitios de unión de NtcA en la región promotora de *rbcLXS*. Uno de estos sitios solapa con el inicio de la transcripción del operón, lo que sugiere que NtcA podría actuar como represor de la expresión del mismo (Ramasubramanian *et al.*, 1994). El análisis de la expresión de *rbcLXS* en la estirpe silvestre durante el proceso de diferenciación de los heterocistos mostró que a las 6 y 12 h de incubación de los filamentos en ausencia de nitrógeno combinado los niveles de transcrito disminuían, pero se recuperaban a las 24 h de inducción (Fig. 3.10B). Consistentemente con el posible papel represor de NtcA en la expresión de *rbcLXS*, en la estirpe CSEL1 se observó que los niveles de transcrito eran inferiores a los de la estirpe silvestre en todas las muestras (Fig. 3.10B).



### 3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *ntcA* DE *Anabaena* sp. PCC 7120

En *Anabaena* sp. PCC 7120 la expresión de *ntcA*, que es mayor en condiciones de crecimiento diazotrófico que en medio con nitrógeno combinado, presenta un patrón complejo (Ramasubramanian *et al.*, 1996; Muro-Pastor *et al.*, 2002). Durante el desarrollo de los heterocistos se produce un incremento transitorio de la cantidad de transcrito *ntcA* alcanzándose el máximo a las 6-12 h de incubación en ausencia de nitrógeno combinado (Muro-Pastor *et al.*, 2002). La región promotora de *ntcA* da lugar a tres inicios de la transcripción (Muro-Pastor *et al.*, 2002; Ramasubramanian *et al.*, 1996). La expresión desde el promotor P<sub>1</sub> tiene lugar a partir de la posición -49, es decir, produce un transcrito con el extremo 5' en el nucleótido 49 anterior al inicio de la traducción del gen, la del P<sub>2</sub> desde la posición -136, y la del P<sub>3</sub> desde la posición -180 (Fig. 3.11). La inducción transitoria durante el proceso de diferenciación se debe al incremento de transcripción desde el P<sub>1</sub>, promotor que también se utiliza a niveles inferiores en medio con nitrógeno combinado, y desde el P<sub>3</sub>, promotor que funciona sólo en ausencia de nitrógeno combinado y de forma transitoria. Por otra parte, la expresión desde el P<sub>2</sub> es independiente de la fuente nitrogenada teniendo lugar de forma constitutiva. La expresión desde el P<sub>1</sub> es muy fuerte en los heterocistos, según se ha deducido de estudios llevados a cabo con RNA aislado de estas células diferenciadas, y depende de NtcA y HetR, proteínas que también regulan la expresión desde el P<sub>3</sub> (Muro-Pastor *et al.*, 2002). Parece que el P<sub>3</sub> se requiere en un estadio intermedio durante el proceso de diferenciación, mientras que el P<sub>1</sub> es el que se utiliza en el heterocisto maduro (Ramasubramanian *et al.*, 1996; Muro-Pastor *et al.*, 2002). El análisis de protección frente a la degradación por DNasa I llevado a cabo por Ramasubramanian *et al.* (1996) mostró la existencia de un sitio de unión de NtcA de secuencia GTAN<sub>8</sub>AAC centrado en la posición -143,5. Centrado en la posición -103,5 existe otro posible sitio de unión de NtcA cuya secuencia se ajusta a la secuencia consenso GTAN<sub>8</sub>TAC (Fig. 3.11). Aunque este segundo sitio no se localizó en el análisis de protección frente a degradación con DNasa I de Ramasubramanian *et al.* (1996), la unión de NtcA al mismo podría dar lugar a una de las dos bandas observadas en ensayos de retardo llevados a cabo con NtcA y un fragmento de DNA correspondiente al promotor de *ntcA* de *Anabaena* (Laurent *et al.*, 2005). No se ha identificado ninguna secuencia consenso de unión de NtcA en la región anterior al TSP -180. Mediante experimentos de complementación en trans de un mutante insercional de *ntcA* se dedujo que la región que incluye el TSP -180 (fragmento que incluye 251 pb del P<sub>ntcA</sub>) se requiere para el crecimiento diazotrófico (Wei *et al.*, 1994); sin embargo, el fragmento que sólo incluye el TSP -49 (fragmento con 87 pb del P<sub>ntcA</sub>) permite el crecimiento con nitrato pero no a expensas de dinitrógeno (Wei *et al.*, 1994).



**Figura 3.11. Región promotora de *ntcA* en *Anabaena* sp. PCC 7120.** En el panel A se muestra un esquema de la región. El inicio del gen *ntcA* se indica como +1. Las flechas indican la localización de los sitios de inicio de la transcripción y las cajas grises los hemisitos de los posibles sitios de unión de NtcA. En el panel B se muestra la secuencia de nucleótidos del promotor así como las posibles cajas -10 correspondientes al P<sub>1</sub> y al P<sub>2</sub> (subrayadas).

Con objeto de caracterizar el patrón de expresión de *ntcA* a lo largo del filamento y la contribución de los diferentes elementos de esta región promotora a dicha expresión, se prepararon fusiones traduccionales de la región promotora de *ntcA* con el gen *gfp-mut2* y se analizó su expresión. El gen *gfp* obtenido de la medusa *Aequorea victoria* determina la proteína testigo GFP (“Green Fluorescent Protein”) que, excitada con luz de 395 nm de longitud de onda, emite fluorescencia a 509 nm (luz verde), lo que permite localizar su expresión. En este trabajo se ha utilizado la proteína GFPmut2, una versión modificada de la proteína silvestre que presenta el pico de excitación a 481 nm y el de emisión a 507 nm (Cormack *et al.*, 1996).

### 3.2.1. LOCALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *ntcA* EN LOS FILAMENTOS DE *Anabaena* DURANTE EL DESARROLLO DE LOS HETEROCISTOS

Los estudios llevados a cabo con RNA aislado de filamentos completos no permiten determinar si el incremento transitorio de la cantidad de transcrito *ntcA* durante el desarrollo de los heterocistos tiene lugar en todo el filamento o en células concretas. Esta inducción es dependiente de HetR (Muro-Pastor *et al.*, 2002) lo que plantea la posibilidad de que la inducción transitoria de *ntcA* tuviera lugar en los proheterocistos. Además, se ha observado una expresión elevada de *ntcA* desde el

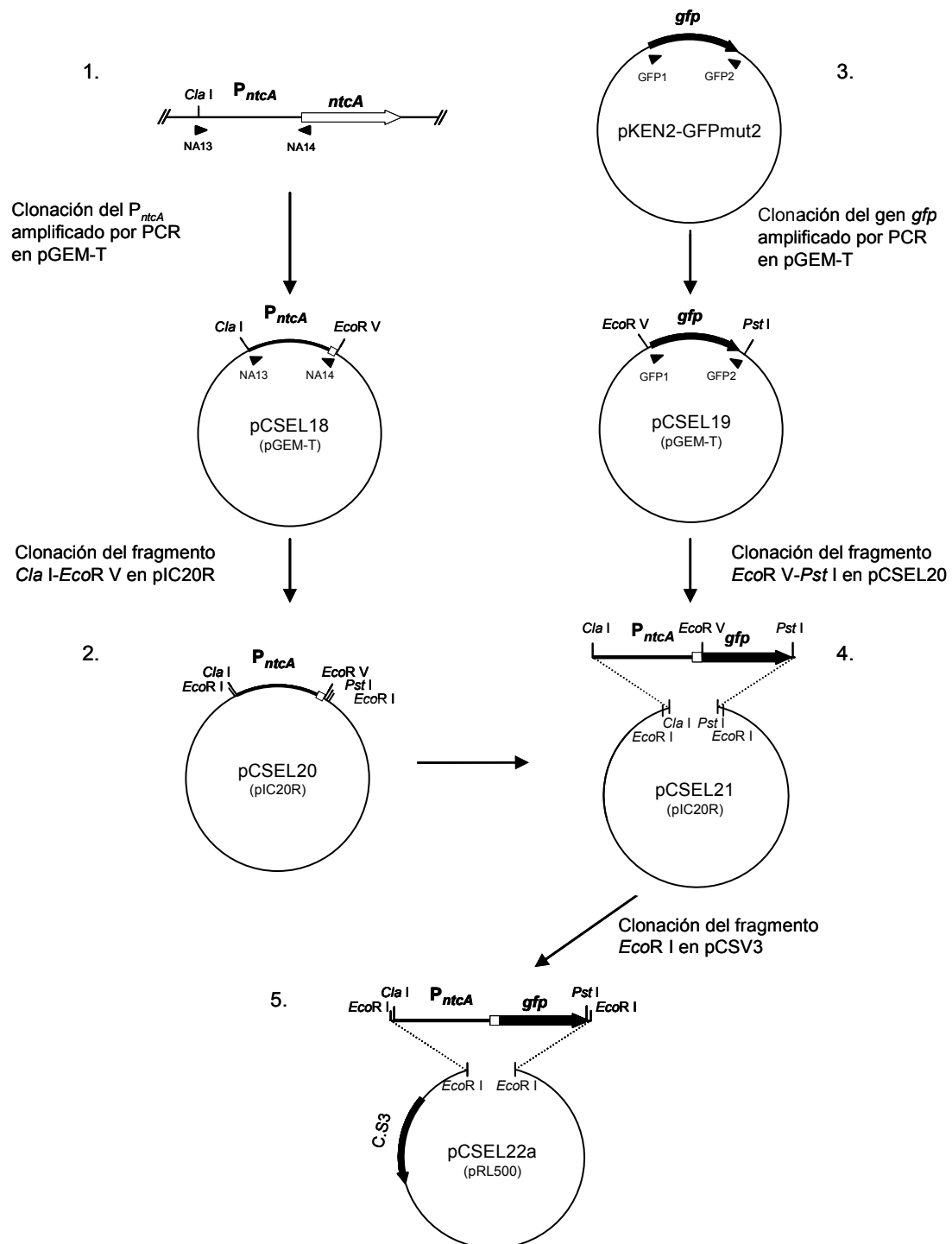
TSP -49 en los heterocistos (Ramasubramanian *et al.*, 1996; Muro-Pastor *et al.*, 2002). Con el fin de determinar el patrón de expresión de *ntcA* en el filamento, se preparó la fusión traduccional del gen *gfp-mut2* con 18 pb del inicio de *ntcA*, de forma que su expresión estuviera dirigida por la región promotora de *ntcA* (603 pb de la región anterior al gen), y se analizó la fluorescencia GFP.

### 3.2.1.1. Preparación de la fusión traduccional del promotor silvestre de *ntcA* y el gen testigo *gfp*

La región promotora de *ntcA*,  $P_{ntcA}$ , (desde la posición -645 a la +24 respecto al sitio de inicio de la traducción de *ntcA*) se amplificó utilizando el plásmido pCSE4 como molde (Tabla 2.4) y los oligonucleótidos NA13 y NA14 como cebadores (Tabla 2.7a; Fig. 3.12). El oligonucleótido NA14, correspondiente al extremo 5' del gen *ntcA*, introduce una diana *EcoR* V para permitir la fusión traduccional con el gen testigo *gfp*. El producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T (Tabla 2.4) obteniéndose el plásmido pCSEL18 (Fig. 3.12.1). Dado que la diana *Cla* I centrada en la posición -600,5 del  $P_{ntcA}$  está afectada por la metilación *dam*, el plásmido pCSEL18 fue transferido a la estirpe GM48 de *E. coli* (Tabla 2.3). El fragmento *Cla* I-*EcoR* V de pCSEL18 que contiene el promotor de *ntcA* se introdujo en el vector pIC20R (Tabla 2.4) digerido con *Cla* I-*EcoR* V, obteniéndose pCSEL20 (Fig. 3.12.2). El plásmido pCSEL19 contiene el gen testigo *gfp-mut2* (Cormack *et al.*, 1996), amplificado por PCR utilizando el plásmido pKEN2-GFPmut2 (Tabla 2.4) como molde y los oligonucleótidos GFP1 y GFP2 (Tabla 2.7a) como cebadores, clonado en el vector pGEM-T (Fig. 3.12.3). El oligonucleótido GFP1 introduce una diana *EcoR* V en el extremo 5' del gen, para permitir la fusión traduccional con el gen *ntcA* (Fig. 3.13). Entre los sitios *EcoR* V y *Pst* I de pCSEL20 se clonó un fragmento *EcoR* V-*Pst* I de pCSEL19 que contenía el gen *gfp*, originándose la fusión entre el promotor de *ntcA* seguido de la secuencia que determina los 6 primeros aminoácidos de NtcA, dos aminoácidos producto de la fusión y el gen *gfp* (Fig. 3.12.4; Fig. 3.13A). El fragmento *EcoR* I de pCSEL21 que contiene la fusión  $P_{ntcA}$ -*gfp* se clonó en la diana *EcoR* I de pCSV3 (plásmido derivado del vector movilizable pRL500 [Tabla 2.4]) obteniéndose el plásmido pCSEL22a (Fig. 3.12.5). También se obtuvo el plásmido pCSEL22b que difería del anterior en la orientación del inserto respecto al vector.

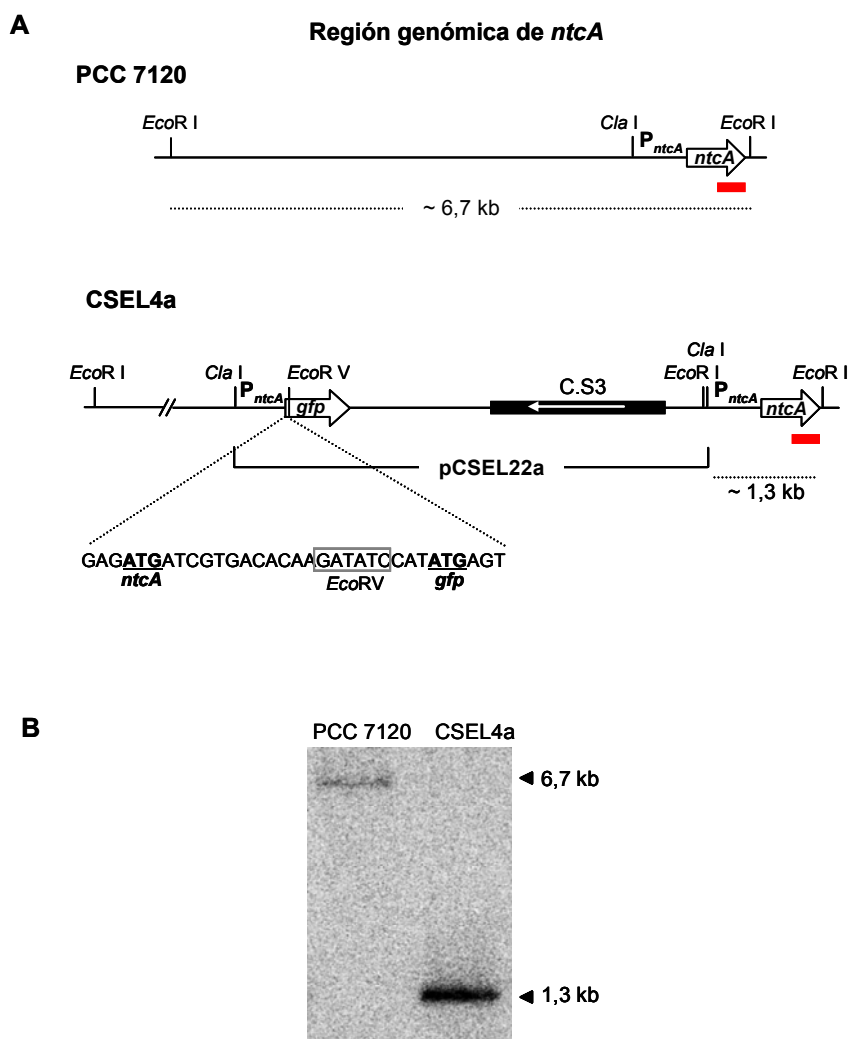
### 3.2.1.2. Generación y caracterización de la estirpe CSEL4a, portadora de la fusión traduccional $P_{ntcA}$ -*gfp* integrada en el cromosoma

El plásmido pCSEL22a se transfirió mediante conjugación, según se describe en el apartado 2.8.2 (Materiales y Métodos), a *Anabaena* sp. PCC 7120. Los exconjugantes fueron seleccionados en medio BG11 suplementado con 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de Sm y 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de Sp. La integración de pCSEL22a mediante recombinación homóloga en la región genómica de *ntcA* dio lugar a la duplicación del promotor de *ntcA*.



**Figura 3.12. Representación esquemática de la construcción de pCSEL22a.** (Ver texto). La región promotora de  $ntcA$  se indica como  $P_{ntcA}$ . Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos negros) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.

En la estirpe resultante, CSEL4a, una copia del promotor de *ntcA* dirigía la expresión de la fusión *ntcA-gfp* y la otra copia (de 603 pb) dirigía la expresión del gen *ntcA* silvestre (Fig. 3.13A). Se obtuvo también la estirpe CSEL4b que portaba el plásmido pCSEL22b integrado en la región genómica de *ntcA*. Dado que ambas estirpes presentaban los mismos niveles de expresión de GFP, en adelante nos referiremos únicamente a la estirpe CSEL4a.



**Figura 3.13. Análisis de la estructura de la región genómica de *ntcA* en la estirpe CSEL4a.** (A) Representación esquemática de la región cromosómica de *ntcA* en *Anabaena* sp. PCC7120 y en la estirpe mutante CSEL4a. Se indica la integración del plásmido pCSEL22a mediante recombinación homóloga en la región cromosómica del gen *ntcA* de la estirpe silvestre PCC 7120, las dianas de restricción relevantes para la construcción y análisis de la estirpe, y la secuencia de nucleótidos correspondiente a la fusión traduccional *ntcA-gfp*, donde se señalan los codones de inicio de la traducción de los genes *ntcA* y *gfp*. La barra roja indica la sonda utilizada para el análisis de la estructura genómica de la estirpe mutante. (B) Análisis de Southern de la organización genómica y segregación del exconjugante CSEL4a. El DNA genómico se digirió con *EcoR* I. Se utilizó como sonda un fragmento de 449 pb, correspondiente a la segunda mitad del gen *ntcA* (ver A), obtenido por restricción *Cla* I-*EcoR* V del plásmido pCSEL14 (Tabla 2.5). A la derecha de la imagen se indica el tamaño de las bandas esperadas, señaladas con líneas discontinuas en el panel A.

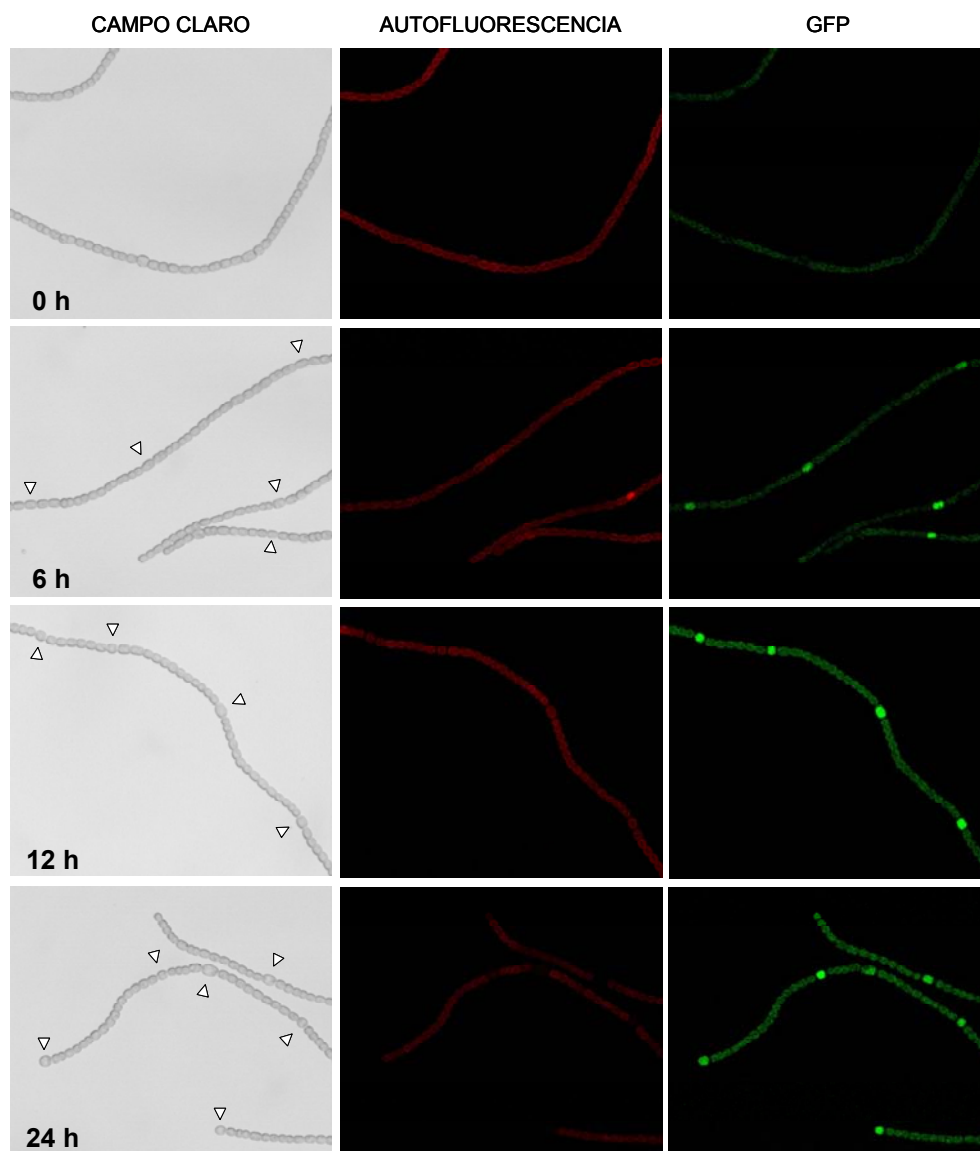
La estructura genómica de la estirpe mutante CSEL4a se confirmó mediante análisis de Southern (Fig. 3.13B). El tamaño de banda esperado en la estirpe silvestre era de unas 6,7 kb mientras que en la estirpe CSEL4a era de 1,3 kb (Fig. 3.13B). Dado que con el DNA aislado de CSEL4a sólo se detectó la banda de 1,3 kb, se puede deducir que esta estirpe sólo contenía cromosomas portadores del plásmido pCSEL22a insertado, careciendo de cromosomas silvestres.

El crecimiento de *Anabaena* a expensas del nitrógeno atmosférico requiere una proteína NtcA funcional. Para determinar si el fragmento de 603 pb anterior al gen *ntcA* era suficiente para dirigir la expresión del mismo en cualquier condición nitrogenada de crecimiento, los exconjugantes se cultivaron en medio BG11<sub>0</sub>, carente de nitrógeno combinado. Las estirpes mutantes obtenidas eran capaces de desarrollar heterocistos funcionales y, por tanto, de crecer en ausencia de nitrógeno combinado, por lo que el fragmento de 603 pb contiene todos los elementos necesarios para la expresión de *ntcA*.

### 3.2.1.3. Análisis de la expresión del gen testigo *gfp* en la estirpe CSEL4a

La visualización de la fluorescencia emitida por la proteína GFP se llevó a cabo mediante microscopía confocal según se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.9). Se estudió la expresión de la fusión  $P_{ntcA}$ -*gfp* en la estirpe CSEL4a en el marco temporal del desarrollo de los heterocistos (Fig. 3.14). En los filamentos creciendo con amonio se observaba un nivel de fluorescencia de GFP muy baja que se incrementaba en todas las células del filamento al incubarlo 12 ó 24 h en ausencia de nitrógeno combinado, indicando un incremento en la producción de GFP. Sin embargo, tras 6 h de incubación sin nitrógeno combinado, algunas células del filamento mostraban un nivel de fluorescencia de GFP más elevado que las células adyacentes. Estas células se identificaron como proheterocistos en virtud de su morfología y por la tinción con azul Alcian, que tiñe los polisacáridos de la envuelta de los proheterocistos y heterocistos (apartado 2.10, Materiales y Métodos). Estos resultados muestran que el incremento de la expresión de *ntcA* que tiene lugar en *Anabaena* sp. PCC 7120 tras la eliminación de la fuente de nitrógeno combinado del medio está localizado en gran medida en los proheterocistos.

La expresión de GFP a partir del  $P_{ntcA}$  también presentaba elevados niveles en los heterocistos maduros, los cuales carecían de la fluorescencia emitida por los pigmentos fotosintéticos (autofluorescencia), como se observa a las 24 h de incubación en ausencia de nitrógeno combinado (Fig. 3.14). Sin embargo, en cultivos establecidos de filamentos creciendo a expensas del nitrógeno atmosférico, algunos heterocistos maduros, probablemente los más viejos, presentaban un descenso en la fluorescencia de GFP (Fig. 3.15). Este resultado sugiere que el incremento de expresión de *ntcA* tiene lugar en el proheterocisto y en el heterocisto maduro de forma transitoria.



**Figura 3.14. Expresión espacial y temporal de la fusión  $P_{ntcA}$ -gfp en la estirpe CSEL4a.** Imágenes de luz transmitida (izquierda), autofluorescencia cianobacteriana (centro) y fluorescencia de la proteína GFP (derecha) de filamentos de la estirpe CSEL4a cultivados en presencia de amonio (0 h) y lavados e incubados 6, 12 ó 24 h en medio sin nitrógeno combinado. Las imágenes fueron adquiridas y procesadas con los mismos parámetros para permitir la comparación de la intensidad de la fluorescencia. Los proheterocistos y heterocistos se indican con triángulos.



**Figura 3.15. Expresión de la fusión  $P_{ntcA}$ -gfp en el heterocisto maduro en la estirpe CSEL4a.** Imágenes de luz transmitida (izquierda), autofluorescencia cianobacteriana (centro) y fluorescencia de GFP (derecha) correspondientes a un filamento de la estirpe CSEL4a cultivado en ausencia de nitrógeno combinado. Con un triángulo blanco se indica un proheterocisto y con un triángulo negro un heterocisto maduro.

### 3.2.2. ANÁLISIS DEL PAPEL DE LOS DISTINTOS ELEMENTOS DEL PROMOTOR DE *ntcA* EN LA EXPRESIÓN DE *ntcA* DURANTE EL DESARROLLO DE LOS HETEROCISTOS

Con el fin de estudiar el papel de los distintos elementos de la región promotora de *ntcA* en la expresión de este gen durante el desarrollo de los heterocistos y en los heterocistos maduros, se llevó a cabo el análisis de la expresión del gen testigo *gfp* bajo la dirección de distintas versiones alteradas del promotor de *ntcA* ( $P_{ntcA}^*$ ). Dichas versiones alteradas pueden agruparse en tres tipos:

- Versiones conteniendo deleciones seriadas del extremo 5' de la región promotora de *ntcA* que eliminan los distintos promotores ( $P_1$ ,  $P_2$  y  $P_3$ ).
- Versiones de la región promotora completa en las que se ha modificado la secuencia de los sitios de unión de NtcA.
- Versiones que permiten el estudio de la expresión desde el  $P_1$  en ausencia del  $P_3$ .

#### 3.2.2.1. Preparación de plásmidos y estirpes de *Anabaena*

##### A. Generación de distintas fusiones traduccionales portando versiones alteradas de la región promotora de *ntcA* y el gen testigo *gfp*

Para el análisis de la expresión desde versiones mutadas de  $P_{ntcA}$  se llevó a cabo una estrategia ligeramente diferente a la descrita en el apartado anterior. Dado que NtcA regula su expresión, es necesario mantener intacta la copia silvestre de *ntcA* situada en el cromosoma, de manera que los efectos observados en la expresión de *gfp* sean sólo atribuibles a las modificaciones introducidas en el  $P_{ntcA}$  fusionado al gen *gfp*. Si las fusiones  $P_{ntcA}^*$ -*gfp* se introdujesen mediante recombinación homóloga en la región *ntcA*, la integración podría generar una estructura cromosómica en la que el promotor silvestre de *ntcA* dirigiera la expresión de *gfp* y la versión modificada  $P_{ntcA}^*$  dirigiera la expresión de *ntcA* pudiendo resultar esta alterada. Para evitarlo, las construcciones se integraron mediante recombinación homóloga en una región prescindible del genoma cianobacteriano. Esta región corresponde al gen *nucA*, que determina una nucleasa (Muro-Pastor *et al.*, 1992) y está localizado en el megaplásmido  $\alpha$  de la estirpe PCC 7120 (Muro-Pastor *et al.*, 1994). Para ello, se generó el plásmido movilizable pCSEL24, derivado del pCSAV80 (Tabla 2.4), que contiene el fragmento correspondiente a las posiciones 388.992 a 391.049 del megaplásmido  $\alpha$  de *Anabaena* (que incluye el gen *nucA* y parte de *nuiA*) clonado entre los sitios *EcoR* I y *EcoR* V del plásmido pBR322, al que se le introdujo en la diana *Bam*H I la casete C.S3 que confiere resistencia a Sm y Sp.

En la Figura 3.16 se esquematiza la estrategia general para la construcción de las fusiones traduccionales  $P_{ntcA}^*$ -*gfp*. La clonación de las distintas versiones o fragmentos de la región promotora de *ntcA* y 18 pb del extremo 5' del gen se llevó a cabo mediante PCR utilizando como



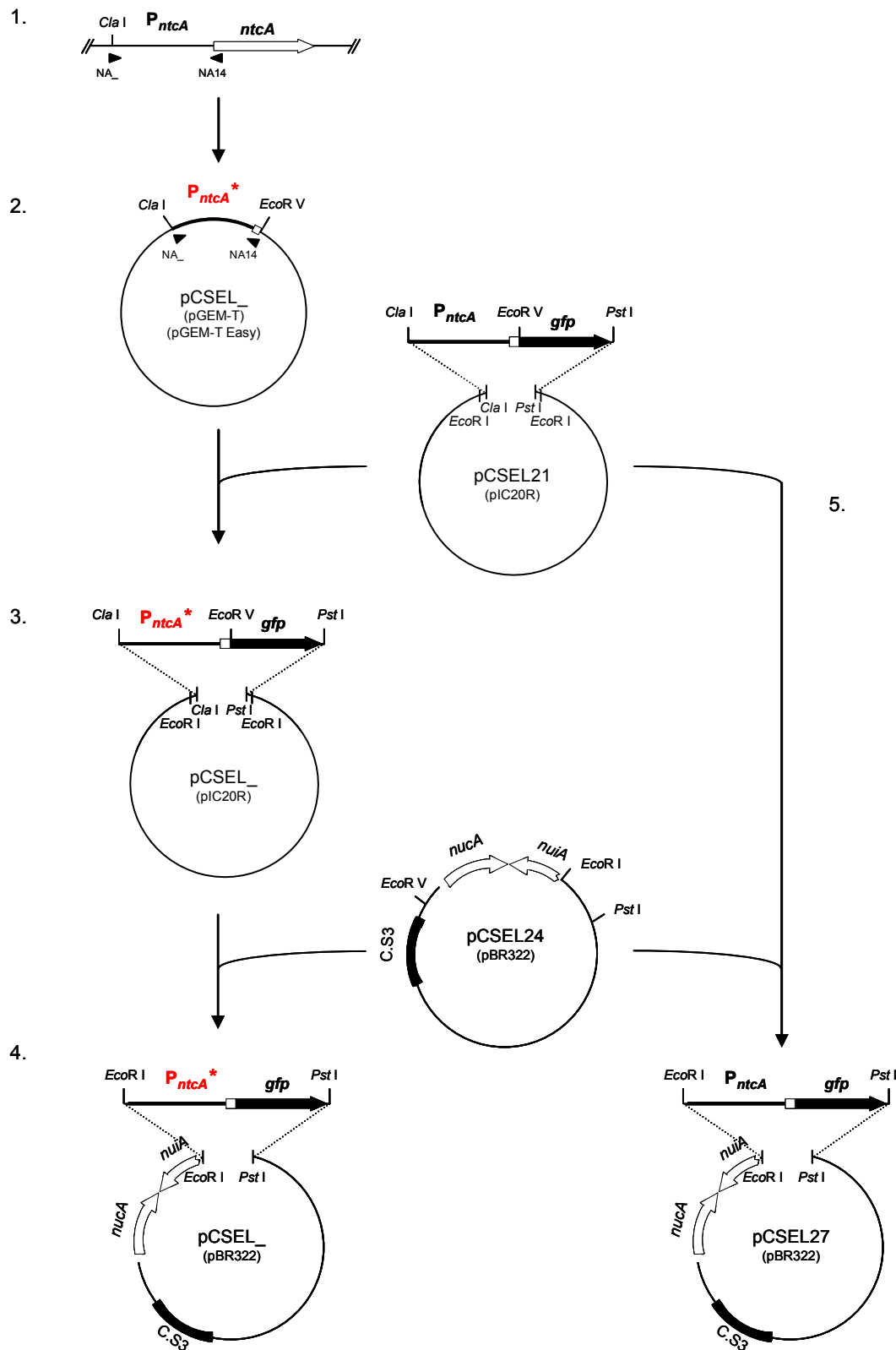


Figura 3.16. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos que portan fusiones traduccionales del gen testigo *gfp* con versiones alteradas del promotor de *ntcA*. (Ver texto). La región promotora de *ntcA* silvestre se indica como  $P_{ntcA}$ , y la versión alterada del mismo como  $P_{ntcA}^*$  (en rojo). Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos negros) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido. Nota: las versiones alteradas de  $P_{ntcA}^*$  no son necesariamente iguales en tamaño.

## Resultados

molde un plásmido, diferente según cada caso (ver más adelante), y los oligonucleótidos NA14, que introduce una diana *EcoR* V al principio del gen *ntcA* que, al igual que en la construcción de la estirpe CSEL4a (apartado 3.2.1.1), permitía la fusión traduccional con el gen *gfp*, y un oligonucleótido, variable en cada caso, que corresponde al extremo 5' desde el que se amplifica la región promotora y que introduce una diana *Cla* I para la clonación posterior del fragmento (Fig. 3.16.1). El producto de PCR obtenido se clonó en el vector pGEM-T o en el pGEM-T Easy (Tabla 2.4; Fig. 3.16.2). La versión silvestre del promotor contenida en pCSEL21 (Tabla 2.5; Fig. 3.12) fue sustituida por los fragmentos *Cla* I-*EcoR* V de estos plásmidos, obteniéndose las distintas fusiones con el gen *gfp* (Fig. 3.16.3). Por último, el fragmento *EcoR* I-*Pst* I que contenía cada fusión  $P_{ntcA}^*-gfp$  se introdujo en el plásmido pCSEL24 (Tabla 2.5) digerido con *EcoR* I y *Pst* I (Fig. 3.16.4).

Como control positivo se utilizó una construcción que portaba el promotor silvestre. El fragmento *EcoR* I-*Pst* I del plásmido pCSEL21 (Tabla 2.5; Fig. 3.12), que contiene la fusión traduccional de 603 pb del promotor de *ntcA* seguido de 18 pb del inicio del gen, con el gen testigo *gfp*, se clonó en pCSEL24 digerido con *EcoR* I y *Pst* I obteniéndose pCSEL27 (Fig. 3.16.5). El control negativo lo constituyó una versión de *gfp* sin región promotora. El gen *gfp* obtenido de pCSEL19 (fragmento *EcoR* V-*Pst* I) se clonó entre los sitios *EcoR* V y *Pst* I en pIC20R dando lugar a pCSEL50. El fragmento *EcoR* I-*Pst* I del plásmido pCSEL50 conteniendo el gen *gfp* sin región promotora se introdujo en pCSEL24 digerido con *EcoR* I-*Pst* I, obteniéndose pCSEL51.

Los plásmidos generados en cada uno de los pasos descritos se resumen en la Tabla 3.1 y se describen en Materiales y Métodos (Tabla 2.5).

**Tabla 3.1. Plásmidos contruidos para la generación de fusiones traduccionales del gen testigo *gfp* con *ntcA* y distintas versiones de  $P_{ntcA}$ , para su integración en la plataforma *nuc*.**

Estirpe	Fragmento del $P_{ntcA}$ <sup>a</sup>	Oligonucleótidos	pGEM-T (Easy)	pIC20R- <i>gfp</i>	pCSEL24
CSEL6	-603 a +18	NA13/NA14	pCSEL18	pCSEL21	pCSEL27
CSEL7	-182 a +18	NA15/NA14	pCSEL28	pCSEL30	pCSEL31
CSEL8	-143 a +18	NA16/NA14	pCSEL32 <sup>e</sup>	pCSEL36	pCSEL38
CSEL9	-92 a +18	NA17/NA14	pCSEL33 <sup>e</sup>	pCSEL37	pCSEL39
CSEL10 <sup>b</sup>	-603 a +18	NACla/NA14	pCSEL35 <sup>e</sup>	pCSEL40	pCSEL41
CSEL11 <sup>c</sup>	-603 a +18	NACla/NA14	pCSEL44	pCSEL45	pCSEL46
CSEL12 <sup>d</sup>	-603 a +18	NACla/NA14	pCSEL47	pCSEL48	pCSEL49
CSEL13				pCSEL50	pCSEL51
CSEL14	-158 a +18	NA30/NA14	pCSEL52	pCSEL56	pCSEL60
CSEL15 <sup>b</sup>	-158 a +18	NA30/NA14	pCSEL53	pCSEL57	pCSEL61
CSEL16 <sup>c</sup>	-158 a +18	NA31/NA14	pCSEL54	pCSEL58	pCSEL62
CSEL17 <sup>d</sup>	-158 a +18	NA31/NA14	pCSEL55	pCSEL59	pCSEL63

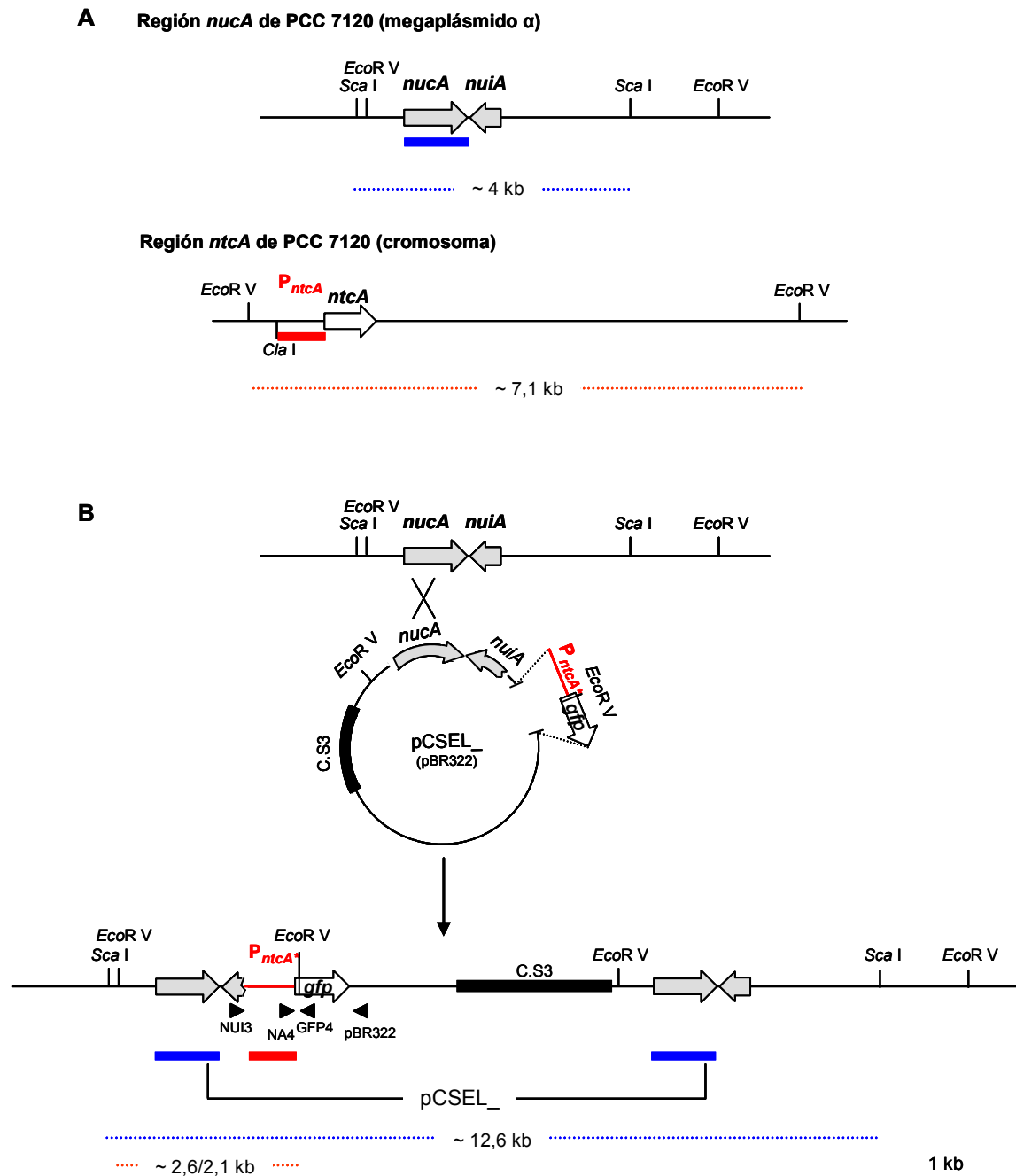
Se muestra la estirpe portadora de cada fusión, así como la versión alterada de la región promotora de *ntcA* correspondiente, los oligonucleótidos utilizados para su clonación y el vector del que deriva cada plásmido.<sup>a</sup> Posición del fragmento respecto al inicio de la traducción de *ntcA*; <sup>b</sup> mutación del sitio de unión de *NtcA* proximal; <sup>c</sup> mutación del sitio de unión de *NtcA* distal; <sup>d</sup> mutación de los dos sitios de unión de *NtcA*; <sup>e</sup> pGEM-T Easy.

### **B. Generación y caracterización de las estirpes portadoras de las fusiones traduccionales del gen *gfp* con versiones alteradas del promotor de *ntcA***

Los plásmidos derivados del pCSEL24 portadores de las distintas fusiones  $P_{ntcA}^*-gfp$  (Tabla 2.5; Tabla 3.1) así como de la fusión control  $P_{ntcA}-gfp$  (pCSEL27) se transfirieron por conjugación a *Anabaena* sp. PCC 7120 (apartado 2.8.2). Al contener secuencias correspondientes a las regiones *nucA* y *ntcA*, los plásmidos transferidos podían integrarse mediante recombinación homóloga en cualquiera de estas dos regiones del genoma (Fig. 3.17A). Sin embargo, el hecho de que la longitud del fragmento de la región *nucA* (2 kb) fuera mayor que la del fragmento de la región *ntcA* (0,6 kb como máximo) hacía más probable la recombinación homóloga en la región *nucA*. Como ya se ha mencionado, para analizar la expresión del gen *gfp* desde el  $P_{ntcA}^*$ , dicha fusión debía haberse integrado en la región *nucA*, ya que si se hubiese integrado en la región *ntcA*, la expresión del gen *gfp* quedaría dirigida por la copia silvestre del  $P_{ntcA}$  y la del gen *ntcA* por la versión alterada del mismo ( $P_{ntcA}^*$ ). Para asegurar el mantenimiento de *ntcA* bajo la dirección del promotor silvestre, los exconjugantes fueron seleccionados y cultivados en medio BG11<sub>0</sub>, en el que se requiere una proteína NtcA con un patrón de expresión silvestre, suplementado con 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de Sm y 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de Sp.

La estructura genómica de las regiones *ntcA* y *nucA* en las estirpes obtenidas se estudió mediante análisis de Southern (apartado 2.2.7). Para ello se utilizó DNA genómico digerido con *EcoR* V y se hibridó con una sonda correspondiente a un fragmento de 628 pb de la región promotora de *ntcA* (desde -603 a +24 respecto al inicio de traducción de *ntcA*; Fig. 3.17), producto de la reacción de PCR con los oligonucleótidos NAC1a y NA14 (Tabla 2.7a) y el plásmido pCSEL18 como molde (Tabla 2.5). En la estirpe silvestre se obtenía una banda de 7,1 kb, mientras que en las estirpes mutantes portadoras de las fusiones integradas en la región genómica de *nucA* se observaba la banda silvestre y otra banda que variaba entre 2,1 y 2,6 kb dependiendo de la versión del promotor de *ntcA* introducida (ver más adelante). Una vez que se había determinado que el plásmido se había integrado en el megaplásmido  $\alpha$ , se estudiaba el grado de segregación mediante análisis de Southern. Se utilizó DNA genómico digerido con *Sca* I y, como sonda, un fragmento de 844 pb correspondiente al gen *nucA* amplificado por PCR utilizando el plásmido pCSAV80 como molde (Tabla 2.4) y los oligonucleótidos NUC1 y NUC2 como cebadores (Tabla 2.7a).

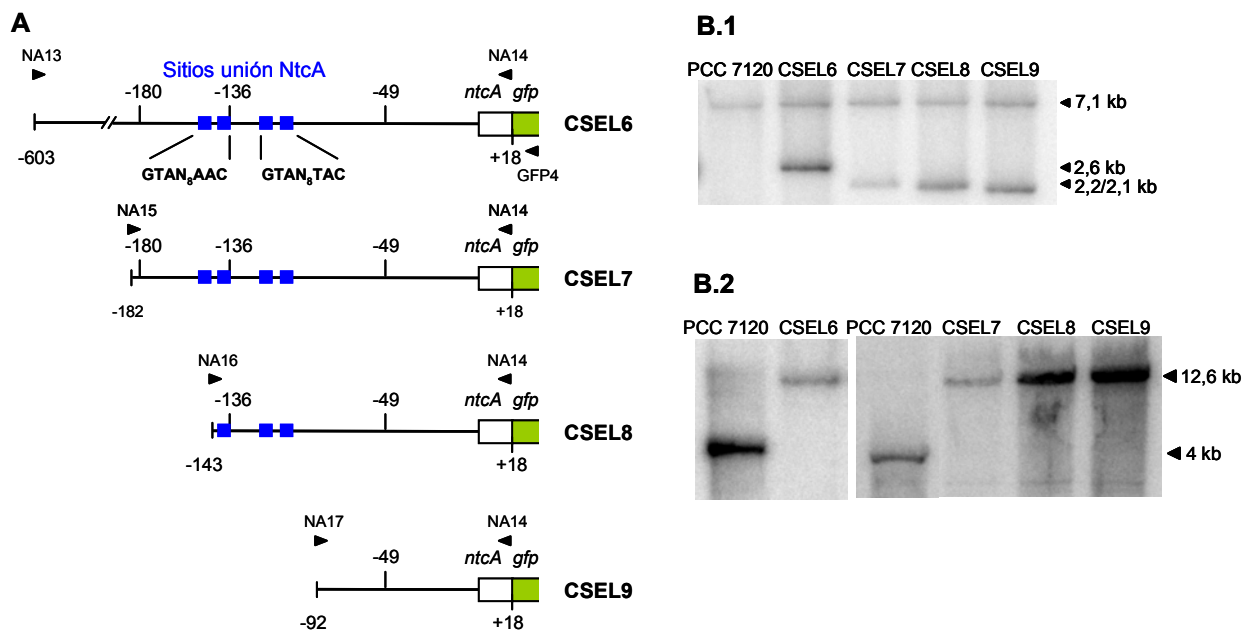
Adicionalmente, se confirmó que el gen *gfp* estaba bajo la dirección de la versión del  $P_{ntcA}^*$  correspondiente en cada caso mediante amplificación por PCR del fragmento anterior a *gfp* y posterior secuenciación. Se utilizó como molde el DNA genómico aislado de las estirpes mutantes y los oligonucleótidos NUI3 y GFP4 como cebadores (Fig. 3.17; Tabla 2.7a).



**Figura 3.17. Representación esquemática de las regiones de *nucA* y *ntcA* en *Anabaena* sp. PCC 7120 y de la región *nucA* en las estirpes portadoras de fusiones traduccionales  $P_{ntcA}$ -*gfp*. Se muestran las dos regiones en la estirpe silvestre (A) y el resultado de la integración de los plásmidos pCSEL<sub>-</sub>, derivados de pCSEL24, mediante recombinación homóloga en la región *nucA* de la estirpe PCC 7120 (B). Se señalan las dianas de restricción relevantes y la posición de las sondas correspondientes a *nucA* (barra azul) o al promotor de *ntcA* (barra roja) utilizadas en el análisis de la estructura genómica. Con línea discontinua se indica el tamaño de las bandas esperadas en el análisis de Southern tras digerir el DNA con *EcoR* V (en rojo) o *Sca* I (en azul) e hibridar con las sondas *nucA* (azul) o *ntcA* (rojo), respectivamente.  $P_{ntcA}$ , promotor de *ntcA*;  $P_{ntcA}^*$ , versión modificada del promotor de *ntcA*.**

### 3.2.2.2. Deleciones seriadas de la región promotora de *ntcA*

Para el análisis del papel de cada uno de los promotores ( $P_1$ ,  $P_2$  y  $P_3$ ) en la expresión del gen *ntcA*, se prepararon tres versiones de la región promotora delecionada por su extremo 5' (Fig. 3.18A). Los fragmentos fueron amplificados por PCR utilizando como molde el plásmido pCSE4 (Tabla 2.4) y los oligonucleótidos NA14 (ver apartado 3.2.2.1A) y NA15, NA16 ó NA17 (Tablas 2.7a). Tras seguir la estrategia descrita en el apartado anterior, se obtuvieron estirpes que tenían integrada en la plataforma *nucA* la fusión traduccional de la región promotora de *ntcA* (182 pb en la estirpe CSEL7, 143 pb en la estirpe CSEL8 y 92 pb en la estirpe CSEL9) con 18 pb que codifican los 6 primeros aminoácidos de NtcA y el gen *gfp*. La integración de las construcciones en la plataforma *nucA* se confirmó mediante análisis de Southern según se describe en el apartado 3.2.2.1B (Fig. 3.18B). Se utilizó como control positivo la estirpe CSEL6 que contenía el gen *gfp* bajo la dirección del  $P_{ntcA}$  completo (603 pb) integrado en la plataforma *nucA* (Fig. 3.18A; Tabla 3.1).



**Figura 3.18. Representación esquemática de las deleciones seriadas de la región promotora de *ntcA* fusionadas al gen testigo *gfp* (A) y análisis de la estructura genómica y segregación de las estirpes CSEL6, CSEL7, CSEL8 y CSEL9 (B).** (A) En el esquema se indica la localización aproximada de los TSPs del  $P_{ntcA}$  (-49, -136 y -180), de los dos sitios de unión de NtcA (cajas azules) y de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos (triángulos negros). También se indica la posición del oligonucleótido GFP4 utilizado en el ensayo de extensión de cebador (ver más adelante). La estructura genómica de las estirpes portadoras de la fusión  $P_{ntcA}^*$ -*gfp* o  $P_{ntcA}$ -*gfp* en la región *nucA* (B.1) y el grado de segregación (B.2) se determinaron mediante análisis de Southern. El DNA genómico se digirió con *EcoR* V y se hibridó con una sonda de la región promotora de *ntcA* (B.1), o se digirió con *Sca* I y se hibridó con una sonda de la región *nucA* (B.2) (ver Fig. 3.17). A la derecha de las imágenes se indica el tamaño de las bandas esperadas (ver Fig. 3.17).

### A. Análisis de la expresión del gen *gfp*

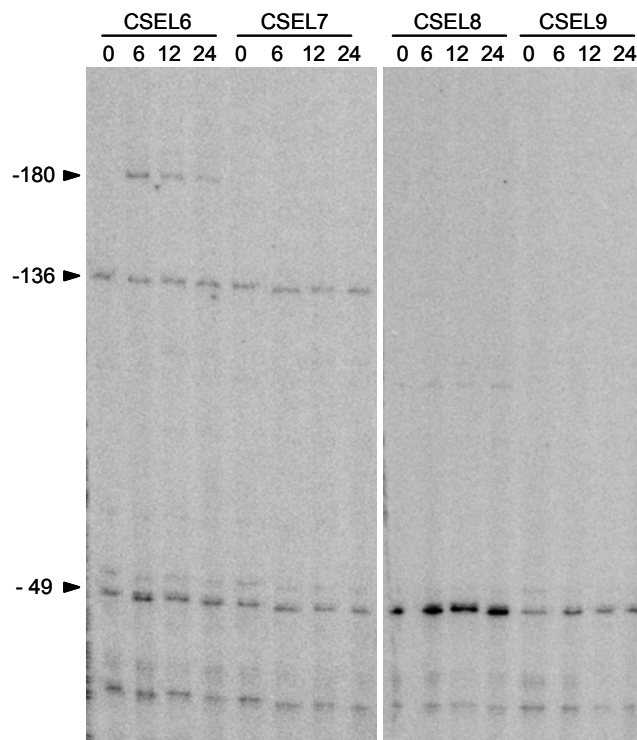
#### Ensayo de extensión de cebador

Con el fin de determinar los transcritos que se estaban produciendo desde las versiones alteradas del promotor de *ntcA*, se llevaron a cabo ensayos de extensión de cebador (apartado 2.3.5) con un oligonucleótido, GFP4, correspondiente al gen *gfp* (Fig. 3.18A; Tabla 2.7a) y RNA aislado de filamentos creciendo con amonio o cultivados con amonio e incubados durante 6, 12 ó 24 h en ausencia de nitrógeno combinado. Los tres transcritos que se generan desde la región promotora de *ntcA*, que corresponden a los TSPs -180 (P<sub>3</sub>), -136 (P<sub>2</sub>) y -49 (P<sub>1</sub>), se observaron en el RNA aislado de filamentos de la estirpe control CSEL6 incubados en ausencia de nitrógeno combinado. El comportamiento de cada uno de los TSPs era consistente con el descrito para el gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Muro-Pastor *et al.*, 2002), es decir, mientras que el P<sub>2</sub> era utilizado de forma constitutiva, el P<sub>1</sub> y el P<sub>3</sub> se inducían tras el paso a un medio sin nitrógeno combinado (Fig. 3.19).

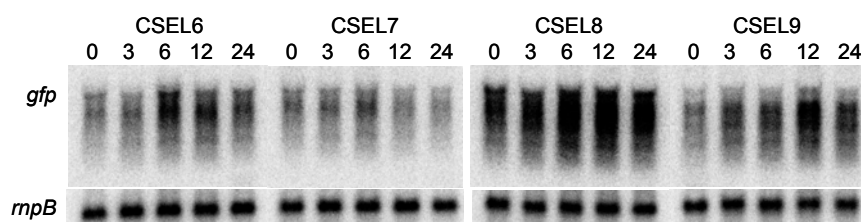
Como resultado de las delecciones introducidas, el transcrito correspondiente al TSP -180 no se observó con RNA aislado de la estirpe CSEL7, y ni el transcrito -180 ni el -136 se observaron utilizando RNA aislado de las estirpes CSEL8 y CSEL9 (Fig. 3.19). Por el contrario, el correspondiente al TSP -49 sí se observó en las tres estirpes mutantes, y su nivel era superior en la estirpe CSEL8, incluso en condiciones de crecimiento con amonio.

#### Análisis de northern

Los niveles de expresión del gen *gfp* se determinaron mediante análisis de northern con RNA aislado de filamentos completos creciendo con amonio o cultivados con amonio e incubados 3, 6, 12 ó 24 h en ausencia de nitrógeno combinado. Como se observa en la Figura 3.20, en todas las estirpes había un incremento de expresión tras el paso de las células a medio sin nitrógeno combinado, aunque los niveles de mRNA variaban según la versión del promotor de *ntcA* que estuviera dirigiendo la transcripción de *gfp*. La delección del fragmento anterior a la posición -182 (estirpe CSEL7) resultaba en una disminución de la cantidad de transcrito respecto a la estirpe control (CSEL6). Lo contrario sucedía en la estirpe CSEL8, en la que el promotor se encuentra delecionado por delante de la posición -143. Cabe destacar el notable incremento de los niveles de transcrito observado en la estirpe CSEL8, incluso en filamentos creciendo con amonio, lo que es consistente con lo observado en los ensayos de extensión de cebador (Fig. 3.19). En CSEL9, donde la expresión de *gfp* tiene lugar desde el promotor P<sub>1</sub> (Fig. 3.19), se observó un nivel de transcrito similar al de la estirpe silvestre.



**Figura 3.19. Determinación de los sitios de inicio de la transcripción del gen *gfp* en las estirpes CSEL6, CSEL7, CSEL8 y CSEL9.** Ensayos de extensión del cebador GFP4 (ver Fig. 3.18) utilizando 25 µg de RNA aislado de filamentos creciendo con amonio (0 h) o cultivados con amonio e incubados durante 6, 12 ó 24 h en ausencia de nitrógeno combinado. Los triángulos indican las posiciones correspondientes a los TSPs del promotor de *ntcA* (-49, -136 y -180).



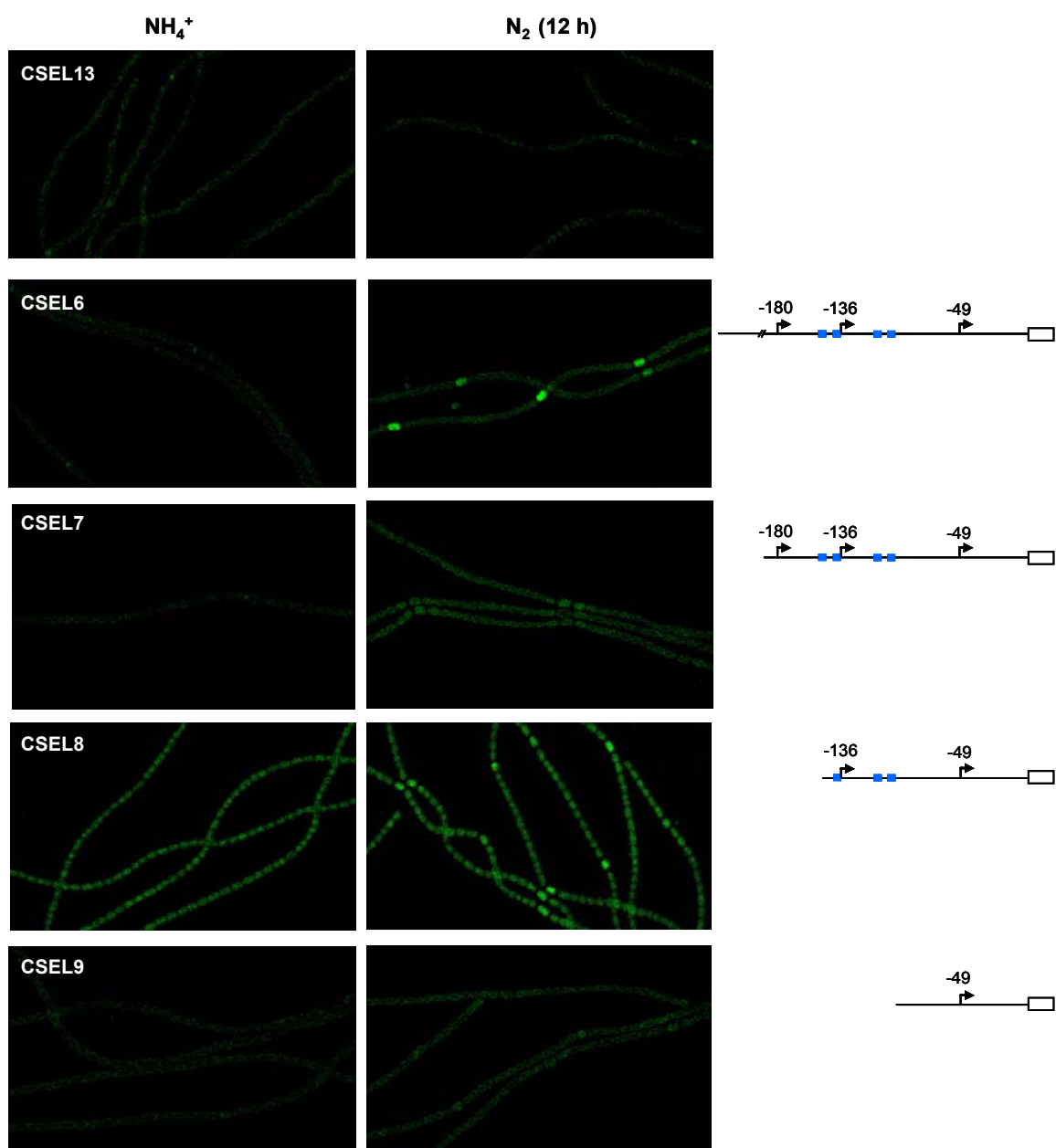
**Figura 3.20. Estudio de la expresión del gen *gfp* bajo la dirección del promotor silvestre de *ntcA* (estirpe CSEL6) o de versiones delecionadas del mismo (estirpes CSEL7, CSEL8 y CSEL9).** El análisis de northern se llevó a cabo con 20 µg de RNA aislado de filamentos de las estirpes CSEL6, CSEL7, CSEL8 y CSEL9 creciendo con amonio (0 h) o cultivados con amonio e incubados 3, 6, 12 ó 24 h en ausencia de nitrógeno combinado. Se utilizó como sonda un fragmento de DNA que contenía el gen *gfp* obtenido mediante PCR utilizando el plásmido pKEN2-GFPmut2 (Tabla 2.4) como molde y los oligonucleótidos GFP1 y GFP2 como cebadores (Tabla 2.7a). Como control de carga y transferencia se hibridó con el gen *rnpB* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (apartado 2.3.4.2, Materiales y Métodos).

### **B. Análisis de la expresión de la proteína GFP**

La visualización de la fluorescencia de la proteína GFP se llevó a cabo mediante microscopía confocal (apartado 2.9, Materiales y Métodos) en filamentos creciendo con amonio o cultivados con amonio e incubados 6, 12 ó 24 h en ausencia de nitrógeno combinado (en la Fig. 3.21 se muestra el análisis en amonio y a las 12 h de inducción). En la estirpe CSEL6 se observó una expresión basal en todas las células del filamento en medio con amonio, que se vio incrementada ligeramente en deficiencia de nitrógeno combinado (12 h). Sin embargo, como se ha descrito previamente para la estirpe CSEL4a (Fig. 3.14), en la estirpe CSEL6 también se localizaron altos niveles de fluorescencia GFP en los proheterocistos. La estirpe utilizada como control negativo (CSEL13) mostró un nivel de fluorescencia similar a la estirpe CSEL6 en amonio, que no se incrementó al cultivar las células en ausencia de nitrógeno combinado.

En la estirpe CSEL7, portadora de una versión del promotor que incluye desde la posición -182 respecto al inicio de la traducción y en la que el transcrito -180 no se expresa, la proteína GFP presentó un nivel bajo de expresión en las células creciendo con amonio que se incrementó en todo el filamento al incubarlas sin nitrógeno combinado. No se observó, sin embargo, el incremento de expresión en células concretas del filamento, lo que indica que la región delecionada es esencial para la expresión localizada de *ntcA* en los proheterocistos. Por otra parte, la delección por la posición -143 (estirpe CSEL8) resultó en una expresión de la GFP en todo el filamento superior a la observada en las estirpes CSEL6 (control) y CSEL7 tanto en presencia como en ausencia de amonio (Fig. 3.21). Este resultado sugiere que, al menos en ausencia de la región -603 a -182, el DNA entre las posiciones -143 y -182 tiene un papel negativo en la expresión desde el  $P_1$  (el promotor utilizado en CSEL8; ver Fig. 3.19). Además, en la estirpe CSEL8 se observó expresión más elevada en células concretas de filamentos incubados en ausencia de nitrógeno combinado. En la estirpe CSEL9, donde el gen *gfp* está bajo la dirección de sólo 92 pb del  $P_{ntcA}$ , los niveles de fluorescencia de la GFP eran muy bajos en los filamentos creciendo con amonio y se observó un ligero incremento en todas las células al incubarlos sin nitrógeno combinado (Fig. 3.21; ver también Fig. 3.20). Los resultados obtenidos con las estirpes CSEL8 y CSEL9 indican que el fragmento de DNA situado entre las posiciones -143 y -92 ejerce un papel positivo en la localización de *ntcA*. Hay que señalar que en esta región del promotor se encuentra uno de los sitios de unión de NtcA (centrado en la posición -103,5).





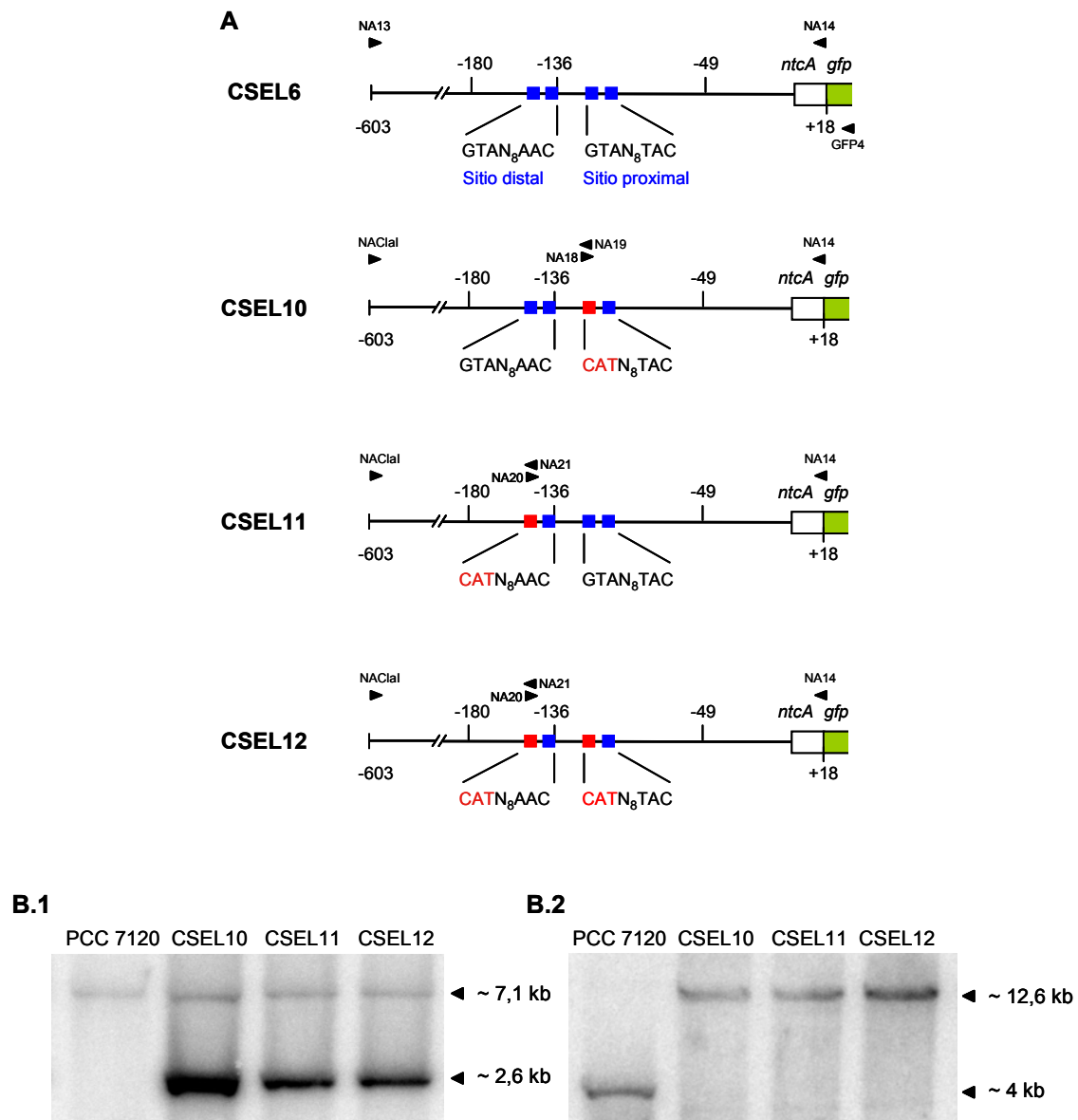
**Figura 3.21. Fluorescencia de la proteína GFP en las estirpes CSEL6, CSEL7, CSEL8, CSEL9 y CSEL13.** Los filamentos se cultivaron con amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o se cultivaron con amonio e incubaron durante 12 h en ausencia de nitrógeno combinado ( $\text{N}_2$ ). A la derecha se muestra una representación esquemática de las deleciones de la región promotora de *ntcA* fusionadas al gen testigo *gfp* contenidas en cada estirpe. Se indica la localización aproximada de los TSPs (-49, -136 y -180) y los sitios de unión de NtcA (cajas azules). La estirpe CSEL13 contiene el gen *gfp* sin promotor.

### 3.2.2.3. Mutación de los sitios de unión de NtcA

Como ya se ha mencionado, la región promotora de *ntcA* presenta dos posibles sitios de unión de NtcA, uno centrado en la posición -143,5 (GTAN<sub>8</sub>AAC), descrito por Ramasubramanian *et al.* (1996), y otro que se ajusta a la secuencia consenso GTAN<sub>8</sub>TAC situado en la posición -103,5 (Fig. 3.11). A partir de ahora nos referiremos a ellos como sitio de unión “distal” y “proximal” (por su proximidad al gen *ntcA*), respectivamente (Fig. 3.22). Se ha demostrado que la expresión desde el TSP -180 y el incremento de expresión desde el TSP -49 son dependientes de NtcA (Muro-Pastor *et al.*, 2002). En el caso del P<sub>1</sub>, la regulación de la expresión desde el TSP -49 podría ejercerse mediante la unión de NtcA a alguno de los sitios descritos. Con objeto de determinar el papel de cada uno de ellos en la expresión de *ntcA*, se prepararon estirpes portadoras de fusiones conteniendo versiones de la región promotora de *ntcA* en las que se había mutado uno de los dos sitios o ambos.

La mutagénesis de los sitios de unión de NtcA se llevó a cabo según el procedimiento del “Megacebador” descrito en el apartado 2.2.6.2 (Materiales y Métodos). La mutación consistió en la sustitución del triplete GTA por la secuencia complementaria CAT tanto en el sitio distal como en el proximal (Fig. 3.22). Para la mutagénesis dirigida del sitio de unión proximal, se utilizó como molde el plásmido pCSE4 (Tabla 2.4) y como cebadores los oligonucleótidos NA18, NA19 (mutagénicos), NA14 y NACla (flanqueantes) (Tabla 2.7a; Fig. 3.22). Para la mutagénesis dirigida del sitio distal se utilizó como molde el plásmido pCSEL18 (Tabla 2.5) y como cebadores los oligonucleótidos NA20, NA21 (mutagénicos), NA14 y NACla (flanqueantes) (Tabla 2.7a; Fig. 3.22). Para la mutación simultánea de ambos sitios de unión de NtcA se utilizó como molde el plásmido pCSEL35 (Tabla 2.5), portador de la región promotora de NtcA mutada en el sitio de unión proximal, y se introdujo la mutación en el sitio distal utilizando los oligonucleótidos NA20 y NA21 (mutagénicos), NA14 y NACla (flanqueantes) (Fig. 3.22). Los productos de PCR fueron secuenciados para comprobar que sólo se habían introducido los cambios deseados (apartado 2.2.8). (Nótese que la mutación del sitio distal anula también la caja -10 del P<sub>2</sub>).

Siguiendo la misma estrategia descrita en el apartado 3.2.2.1A se obtuvieron estirpes que portaban en la región genómica de *nucA* la fusión traduccional del gen *gfp* con 603 pb del P<sub>*ntcA*</sub> (seguido de 18 pb de la región codificante de *ntcA*) conteniendo el sitio de unión de NtcA proximal mutado (estirpe CSEL10), el sitio distal mutado (estirpe CSEL11) o ambos sitios mutados (estirpe CSEL12) (Fig. 3.22). Mediante análisis de Southern se confirmó la segregación y la integración de las construcciones en la región *nucA* (apartado 3.2.2.1B; Fig. 3.22B).



**Figura 3.22. Representación esquemática de las versiones alteradas de la región promotora de *ntcA* (fusionadas al gen testigo *gfp*) que portan mutaciones en los sitios de unión de NtcA (A) y análisis de la estructura genómica y segregación de las estirpes CSEL10, CSEL11 y CSEL12 (B). (A) Los cuadrados azules indican los dos hemisitos que conforman el sitio de unión de NtcA separados por 8 pb (GTAN<sub>8</sub>AAC y GTAN<sub>8</sub>TAC). Las mutaciones introducidas se señalan en rojo. Se indica la posición aproximada de los TSPs (-49, -136 y -180) y de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos (triángulos negros). También se indica la posición del oligonucleótido GFP4, utilizado en el ensayo de extensión de cebador. La estructura genómica de las estirpes portadoras de las fusiones P<sub>*ntcA*</sub>\*-*gfp* en la plataforma *nucA* (B.1) y el grado de segregación (B.2) se estudiaron mediante análisis de Southern. El DNA cromosómico se digirió con *EcoR* V y se hibridó con una sonda de la región promotora de *ntcA* (B.1), o se digirió con *Sca* I y se hibridó con una sonda de la región *nucA* (B.2) (ver Fig. 3.17). A la derecha de las imágenes se indica el tamaño de las bandas esperadas.**

### A. Ensayos de unión de la proteína NtcA

#### Ensayos de retardo en gel

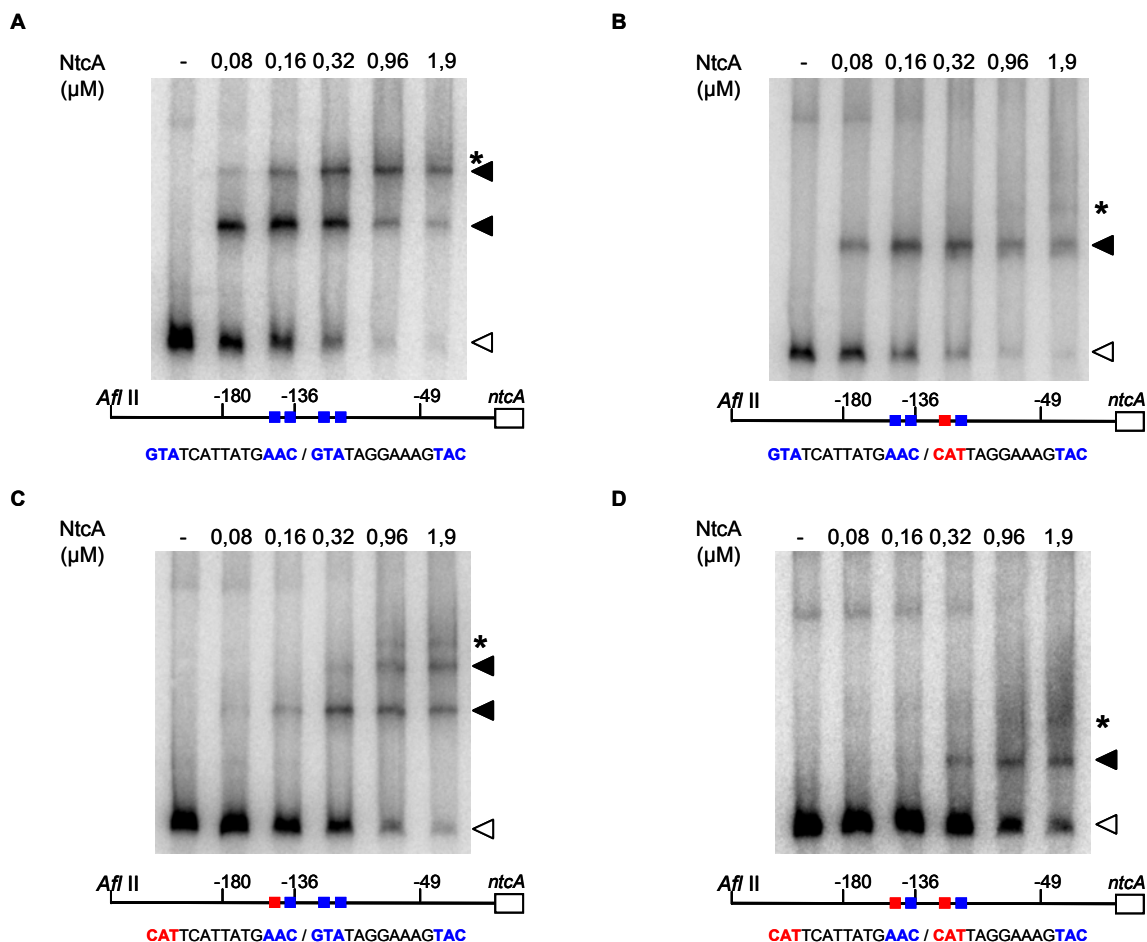
Con el fin de estudiar si la proteína NtcA se unía *in vitro* a los fragmentos del promotor de *ntcA* que portaban alteraciones en la secuencia de los sitios de unión de NtcA, se llevaron a cabo ensayos radiactivos de retardo en gel según se describe en el apartado 2.5.1 (Materiales y Métodos) empleando proteína NtcA purificada (apartado 2.4.4.1).

Los fragmentos correspondientes a las distintas versiones del promotor de *ntcA* se obtuvieron mediante restricción con las enzimas *Afl* II-*Spe* I de los plásmidos pCSEL35 (fragmento B, de 289 pb con el sitio proximal mutado), pCSEL44 (fragmento C, de 289 pb con el sitio distal mutado) y pCSEL47 (fragmento D, de 289 pb con ambos sitios mutados). La versión silvestre del promotor se obtuvo al digerir el plásmido pCSEL18 con *Afl* II y *Nco* I (fragmento A, de 296 pb). En todos los casos, el fragmento incluía el DNA correspondiente a las posiciones -255 a +18 respecto del sitio de inicio de la traducción de *ntcA*.

Como se había observado previamente (Laurent *et al.*, 2005), la unión de NtcA al fragmento silvestre dio lugar a dos bandas retardadas (triángulos negros) que probablemente correspondan al complejo formado por NtcA unido a uno de los sitios (banda retardada inferior) o a ambos sitios (banda retardada superior) (Fig. 3.23A). Cuando el ensayo se realizó con una concentración elevada de NtcA, apareció una tercera banda de intensidad débil (marcada con un asterisco). La mutación del sitio proximal provocó la ausencia de la banda retardada superior (Fig. 3.23B). Sin embargo, la mutación del sitio distal parece que no eliminó completamente la unión de NtcA a este sitio, ya que aún se observaba la banda superior (correspondiente a la unión de NtcA a ambos sitios), aunque a una concentración de NtcA superior a la requerida con el fragmento silvestre (comparar Figuras 3.23A y 3.23C). Este resultado es consistente con el obtenido con el fragmento que tiene ambos sitios mutados (Fig. 3.23D), en el que la una única banda retardada se originó con la misma concentración de NtcA requerida para la formación del complejo NtcA-DNA correspondiente a la segunda banda retardada con el fragmento del  $P_{ntcA}$  que tiene el sitio distal mutado (fragmento C, Fig. 3.23C). La aparición de bandas adicionales cuando se realizó el ensayo en presencia de altas concentraciones de NtcA (marcadas con un asterisco) podría deberse a la existencia de un tercer sitio adicional de baja afinidad no descrito hasta el momento o a la unión inespecífica de alguna proteína contaminante en la preparación de NtcA, aunque no tengamos constancia de su existencia.

Los resultados obtenidos de los ensayos de retardo en gel llevados a cabo con los distintos fragmentos del  $P_{ntcA}$  (Fig. 3.23) muestran que la afinidad de NtcA, en condiciones *in vitro*, por los dos sitios descritos es diferente. En el caso del fragmento que contiene el sitio proximal mutado, la banda retardada (complejo NtcA-sitio distal) se observó con la cantidad de NtcA mínima empleada en los

ensayos (Fig. 3.23B). Sin embargo, la formación del complejo NtcA-sitio proximal requiere mayor cantidad de NtcA (banda retardada inferior, Fig. 3.23C), lo que sugiere que NtcA presenta menor afinidad por el sitio proximal que por el distal, de forma que la banda inferior observada con el fragmento silvestre (Fig. 3.23A) probablemente corresponda a la unión de NtcA al sitio distal.

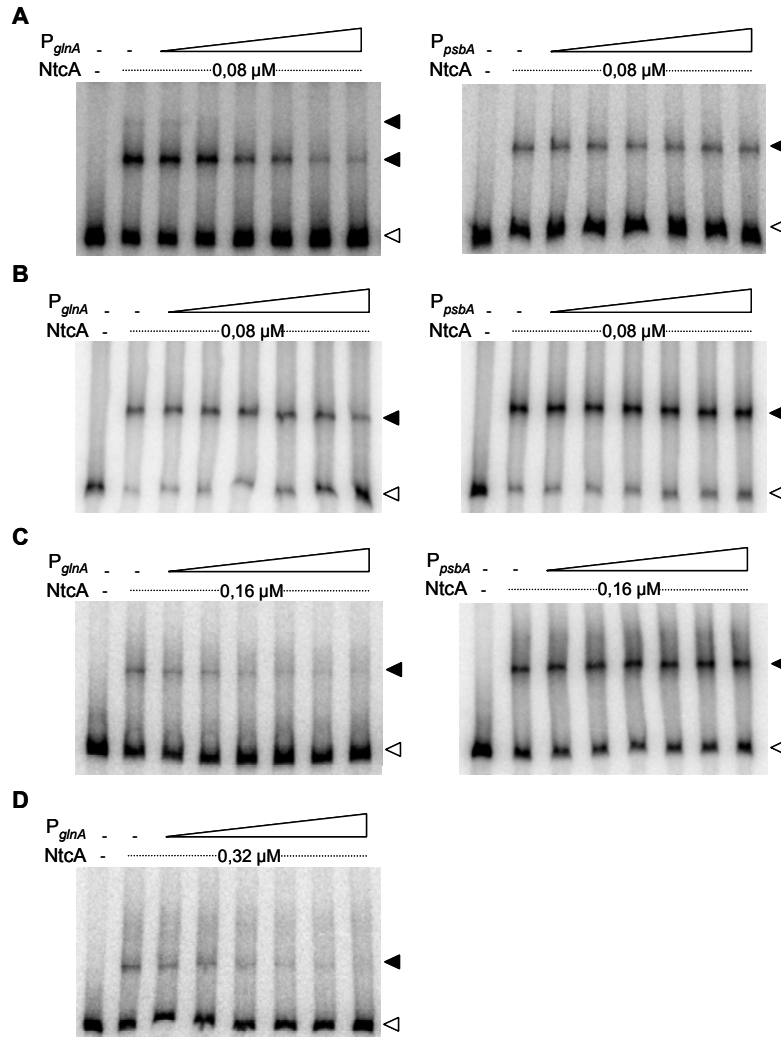


**Figura 3.23. Ensayos de retardo en gel de los fragmentos de  $P_{ntcA}$  silvestre y conteniendo mutaciones en los sitios de unión de NtcA.** Se realizaron ensayos de retardo en gel en presencia de cantidades crecientes de la proteína NtcA purificada (apartado 2.4.4.1). La calle de la izquierda de cada gel corresponde al ensayo sin proteína (-). Los ensayos se realizaron en presencia de 0,1 fmol de fragmento marcado radiativamente correspondiente al  $P_{ntcA}$  silvestre (A),  $P_{ntcA}$  con la mutación en el sitio proximal (B), en el sitio distal (C) o en ambos sitios (D). En cada panel se muestra la secuencia de los sitios de unión de NtcA y se representa esquemáticamente la versión del  $P_{ntcA}$  que se ensaya, donde se señala la posición aproximada de los TSPs y los hemisitos de los sitios de unión de NtcA silvestre (caja azul) y mutados (caja roja). Se indica el fragmento libre (triángulos blancos) y los fragmentos unidos a NtcA (triángulos negros).

Se llevaron a cabo ensayos radiactivos de retardo en gel en presencia de un exceso de DNA competidor no marcado radiativamente (Fig. 3.24). El DNA competidor correspondía a un fragmento conteniendo el promotor  $P_i$  de *glnA* de *Anabaena* (fragmento de -169 a -5), que tiene un sitio de unión de NtcA, o a un fragmento no relacionado del promotor de *psbA* (fragmento de 242 pb) de *Amaranthus hybridus*. Ambos fragmentos se obtuvieron por PCR: el fragmento de  $P_{glnA}$  utilizando los oligonucleótidos GA3 y GA13 (Tabla 2.7a) y el plásmido pAN503 como molde (Tabla 2.4) y el de

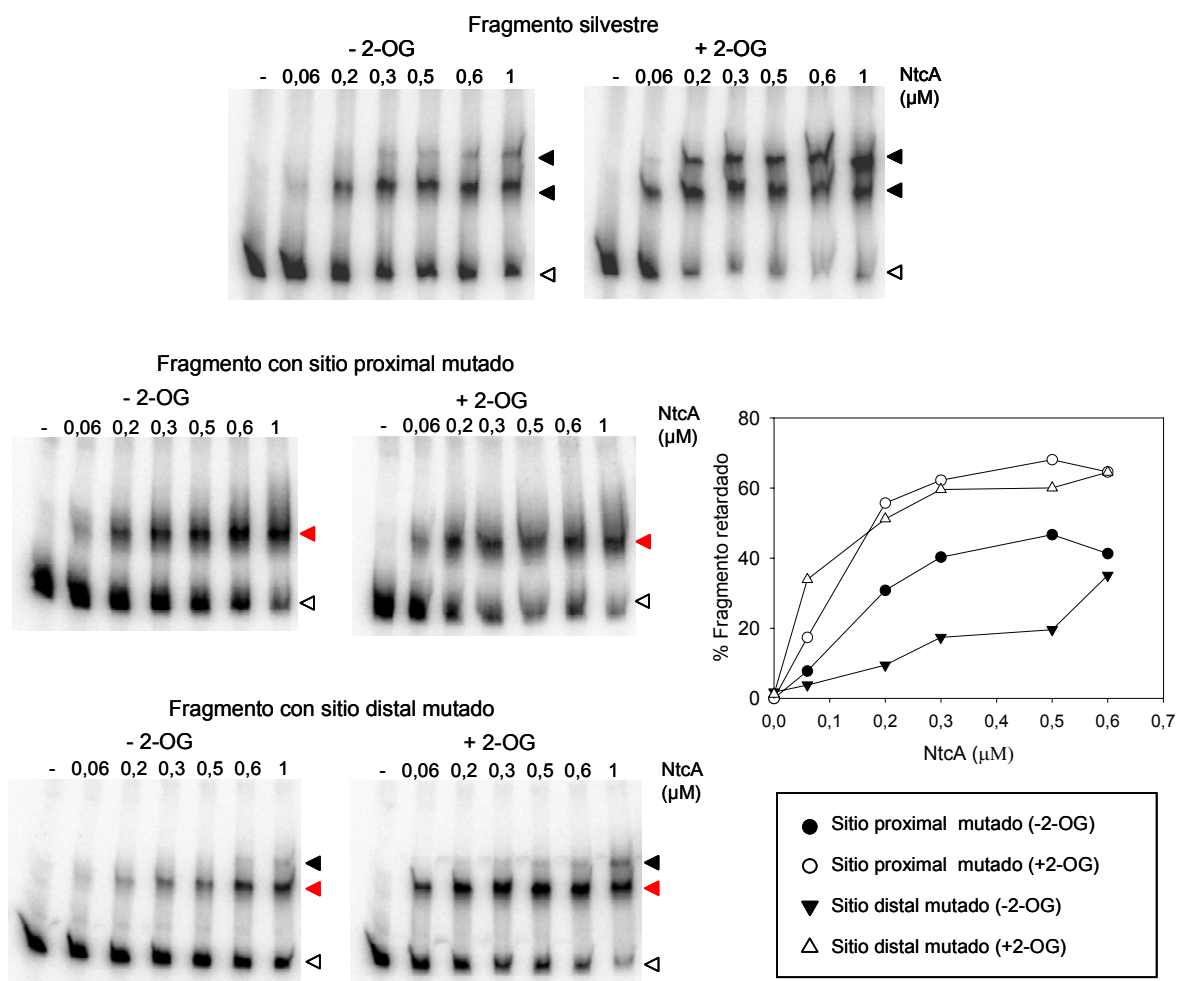
## Resultados

$P_{psbA}$  utilizando los oligonucleótidos CK3-1 y CK3-2 (Tabla 2.7a) y el plásmido pRL278 como molde (Tabla 2.4). En la Figura 3.24 se observa que la presencia de cantidades crecientes de  $P_{glnA}$  en los ensayos hacía que disminuyera la cantidad de banda retardada en todos los casos. Sin embargo, la adición de  $P_{psbA}$  no afectaba a la unión de NtcA al fragmento marcado. Estos resultados indican que NtcA interaccionaba específicamente con el DNA de los fragmentos de  $P_{ntcA}$  que portan mutaciones en los sitios de unión de NtcA.



**Figura 3.24. Ensayos de retardo en gel de los fragmentos de  $P_{ntcA}$  silvestre y conteniendo mutaciones en los sitios de unión de NtcA en presencia de un fragmento competidor no radiactivo específico ( $P_{glnA}$ ) o no específico ( $P_{psbA}$ ).** Se realizaron ensayos de retardo en gel en presencia de la proteína NtcA purificada (apartado 2.4.4.1) con una cantidad variable según el fragmento ensayado. La calle de la izquierda de cada gel corresponde al ensayo sin proteína (-). Los ensayos se realizaron en presencia de 0,1 fmol de fragmento marcado radiactivamente correspondiente al  $P_{ntcA}$  silvestre (A),  $P_{ntcA}$  con mutación en sitio proximal (B), en el sitio distal (C) o en ambos sitios (D) y cantidades crecientes de fragmento competidor no marcado radiactivamente (5, 10, 20, 30, 40 ó 50 fmoles de izquierda a derecha) correspondiente a  $P_{glnA}$  (paneles de la izquierda) o a  $P_{psbA}$  (paneles de la derecha) (ver texto). Se indica el fragmento libre (triángulos blancos) y los fragmentos unidos a NtcA (triángulos negros).

Se analizó, mediante ensayos de retardo en gel, si la capacidad de unión de NtcA purificada a los sitios de unión presentes en la región promotora de *ntcA* se modificaba en presencia de 2-OG (Fig. 3.25). En todos los casos la cantidad de complejo retardado, para una concentración de NtcA determinada, era superior cuando el ensayo se realizaba con 2-OG. Los resultados obtenidos también indican que el efecto positivo del 2-OG es mayor sobre la unión de NtcA al sitio proximal (fragmento C) que al sitio distal (fragmento B). (Nótese que el sitio proximal es de menor afinidad que el distal; Fig. 3.23).



**Figura 3.25. Análisis del efecto del 2-OG en la unión de NtcA a los fragmentos de  $P_{ntcA}$  silvestre y conteniendo mutaciones en los sitios de unión de NtcA.** Se realizaron ensayos de retardo en gel en presencia de cantidades crecientes de la proteína NtcA purificada (apartado 2.4.4.2) y, cuando se indica, 0,6 mM de 2-OG. La calle de la izquierda de cada gel corresponde al ensayo sin proteína (-). Los ensayos se realizaron en presencia de 0,4 fmol de fragmento marcado radiactivamente correspondiente al  $P_{ntcA}$  silvestre,  $P_{ntcA}$  con la mutación en el sitio proximal o  $P_{ntcA}$  con la mutación en el sitio distal. Se indica el fragmento libre (triángulos blancos) y los fragmentos unidos a NtcA (triángulos negros y rojos). A la derecha de los ensayos de retardo en gel con los fragmentos que portan mutaciones se representa gráficamente el porcentaje de fragmento retardado correspondiente a las bandas señaladas con triángulos rojos.

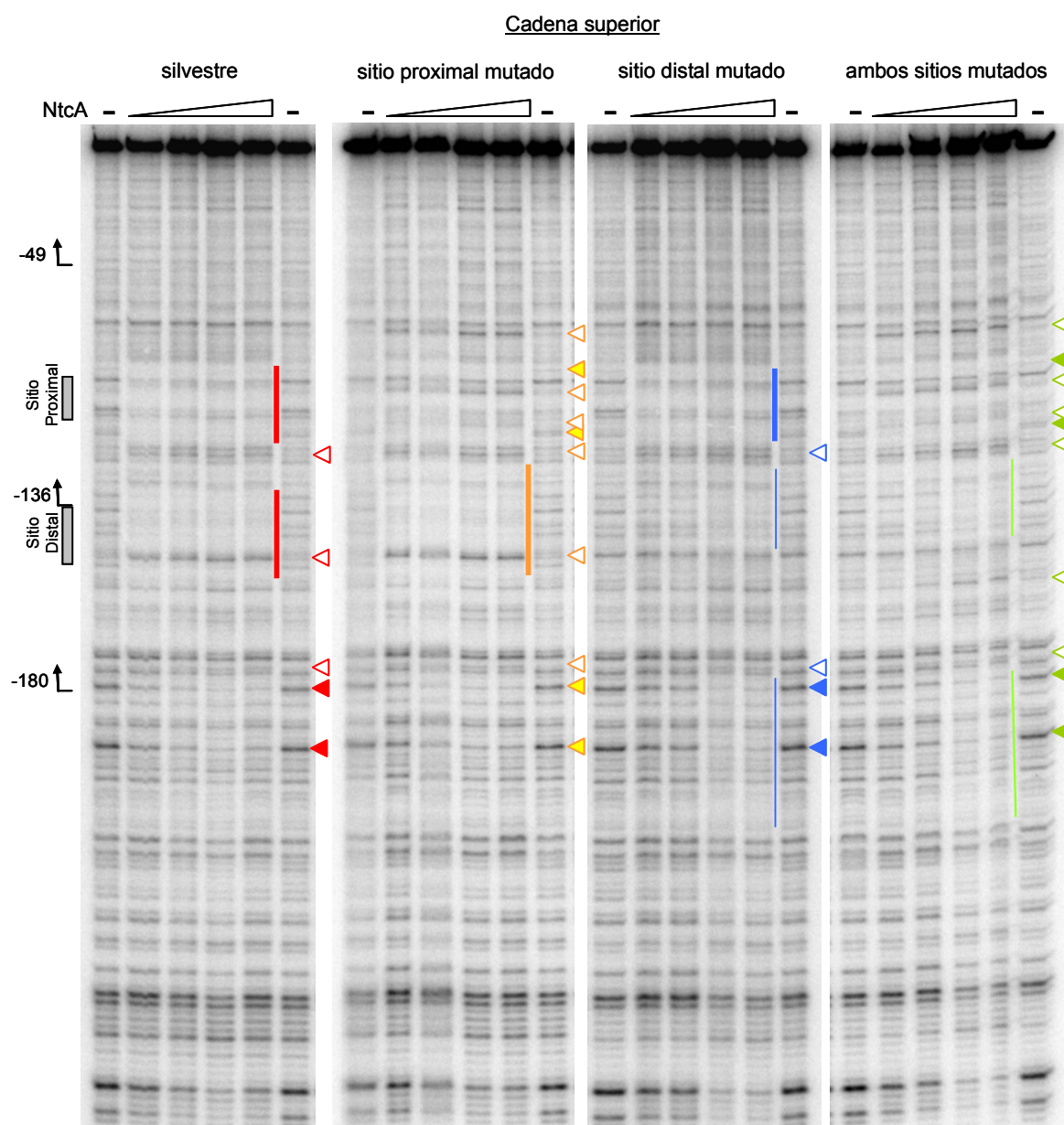
### Ensayos de protección frente a la degradación por DNasa I

Se llevaron a cabo experimentos de protección por NtcA frente a la DNasa I con el objetivo de determinar las regiones que interaccionaban con la proteína NtcA purificada en cada uno de los fragmentos de  $P_{ntcA}$  analizados (apartado 2.5.2, Materiales y Métodos).

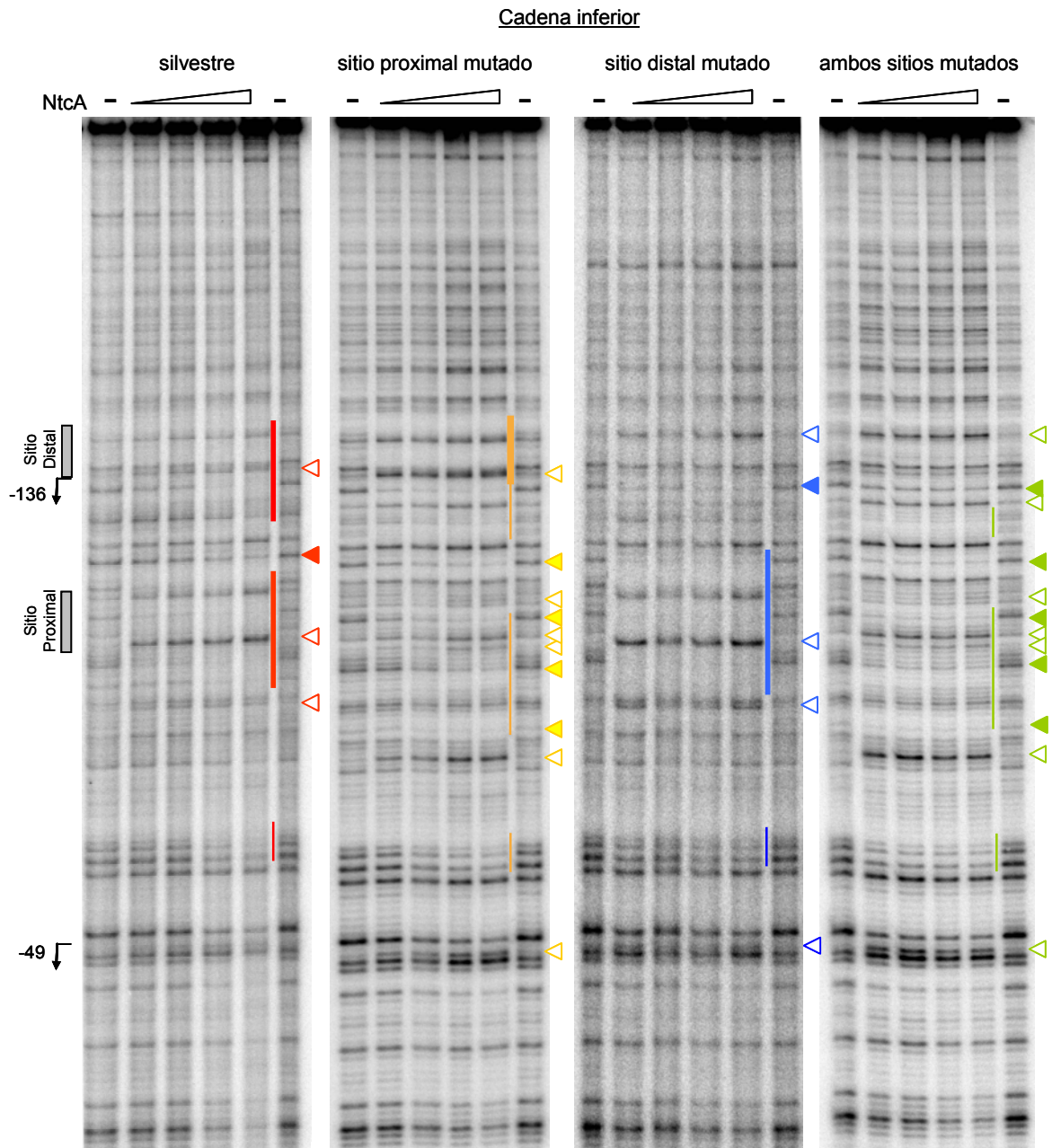
Los fragmentos utilizados se obtenían mediante amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos NA14 y NA8 (Tabla 2.7a) y como molde los plásmidos pCSEL18 (fragmento silvestre), pCSEL35 (mutación sitio proximal), pCSEL44 (mutación sitio distal) o pCSEL47 (mutación de los dos sitios) (Tabla 2.5). Según qué cadena de la doble hélice se quisiera analizar se utilizaba uno de los dos oligonucleótidos marcado radiactivamente, el NA14 para la cadena no codificante (inferior) y el NA8 para la cadena codificante (superior) (Fig. 3.28) (apartado 2.5.2, Materiales y Métodos). Los ensayos de unión de NtcA se realizaron con proteína NtcA purificada (apartado 2.4.4.1). Posteriormente, las mezclas de ensayo se sometieron a digestión con DNasa I. Finalmente, los productos de digestión generados se resolvieron en geles de urea-poliacrilamida (apartado 2.2.8.2, Materiales y Métodos). La incubación del DNA con la proteína NtcA originaba la desaparición (triángulos rellenos) o aparición (triángulos huecos) de determinadas bandas con respecto al patrón de digestión que se obtenía en ausencia de NtcA.

En las Figuras 3.26 y 3.27 se muestra el análisis comparativo de las bandas generadas mediante la digestión con DNasa I de los fragmentos derivados de  $P_{ntcA}$  marcados en la cadena superior e inferior respectivamente. En la Figura 3.28 se representa de forma esquemática la interpretación de los resultados obtenidos. La incubación del fragmento silvestre con la proteína NtcA purificada originaba dos ventanas de protección frente a la degradación por DNasa I (desaparición de bandas) que coincidían con los sitios de unión de NtcA. En el caso del sitio distal, la unión de NtcA protegía una zona que incluía la caja -10 del  $P_2$  así como la posición del TSP correspondiente (-136). Adicionalmente, se observaron bandas que desaparecían en torno a la posición del TSP -180 (Fig. 3.26) y del TSP -49 (Fig. 3.27). En los ensayos llevados a cabo con los fragmentos que tienen mutado alguno de los sitios de unión de NtcA el patrón de digestión obtenido difería del observado con el fragmento silvestre. La alteración de la secuencia del sitio distal no eliminó completamente la protección originada por la unión de NtcA, aunque se requería una mayor cantidad de proteína para que se formara la ventana de protección (Fig. 2.26). La mutación del sitio proximal parece que tuvo un efecto más drástico ya que, aunque alguna de las bandas disminuía su intensidad en presencia de NtcA, no se observaba una ventana de protección. El fragmento que porta alteración de secuencia en los dos sitios de unión de NtcA respondía claramente a la combinación de lo observado con cada mutación de forma independiente.

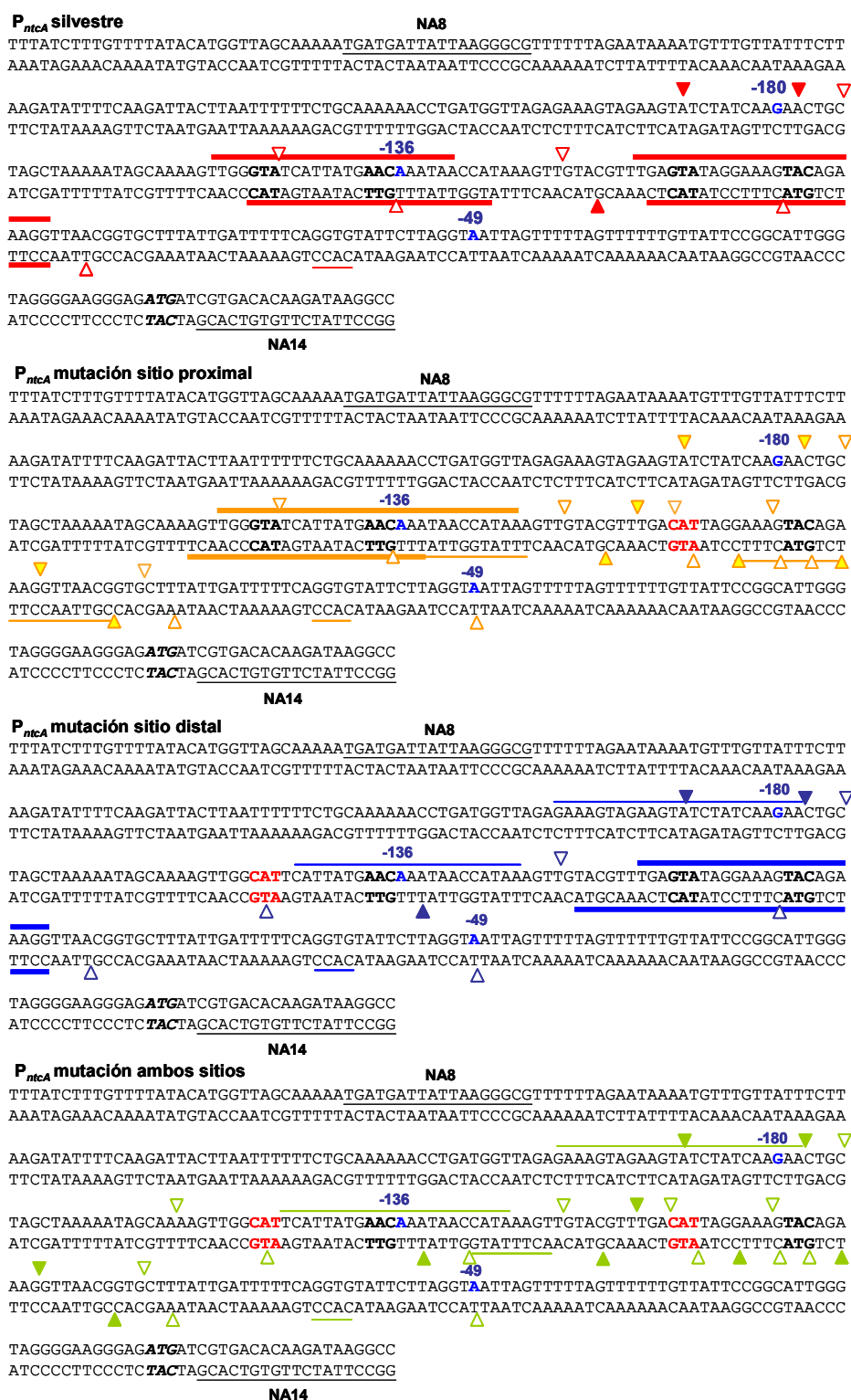




**Figura 3.26. Análisis de protección por NtcA frente a la digestión por DNasa I de fragmentos derivados del promotor de *ntcA* marcados radiactivamente en la cadena codificante (superior).** Los ensayos se llevaron a cabo con 2 fmol de los fragmentos de  $P_{ntcA}$  correspondientes a las versiones silvestre y mutantes portadoras de alteraciones de secuencia en los sitios de unión de NtcA (proximal, distal y ambos sitios) marcados en la cadena superior. El experimento se realizó con concentraciones crecientes de proteína NtcA purificada (0,07, 0,14, 0,27 y 0,41  $\mu\text{M}$ ) (apartado 2.4.4.1). Los triángulos rellenos corresponden a bandas que desaparecen y los triángulos huecos a bandas que aparecen (sitios hipersensibles) respecto a los controles sin NtcA (-). Las líneas verticales delimitan ventanas de protección frente a DNasa I, y su grosor indica la afinidad de NtcA por la secuencia de DNA, siendo las de mayor grosor las que aparecen con menos cantidad de proteína (mayor afinidad). A la izquierda de la imagen se indica la situación aproximada de los sitios de unión de NtcA y de los sitios de inicio de la transcripción en el  $P_{ntcA}$  (-49, -136 y -180).



**Figura 3.27. Análisis de protección por NtcA frente a la digestión por DNasa I de fragmentos derivados del promotor de *ntcA* marcados radiactivamente en la cadena no codificante (inferior).** Los ensayos se llevaron a cabo con 2 fmol de los fragmentos de  $P_{ntcA}$  correspondientes a las versiones silvestre y mutantes portadoras de alteraciones de secuencia en los sitios de unión de NtcA (proximal, distal y ambos sitios) marcados en la cadena inferior. El experimento se realizó con concentraciones crecientes de proteína NtcA purificada (0,07, 0,14, 0,27 y 0,41  $\mu$ M) (apartado 2.4.4.1). Los triángulos rellenos corresponden a bandas que desaparecen y los triángulos huecos a bandas que aparecen (sitios hipersensibles) respecto a los controles sin NtcA (-). Las líneas verticales delimitan ventanas de protección frente a DNasa I, y su grosor indica la afinidad de NtcA por la secuencia de DNA, siendo las de mayor grosor las que aparecen con menos cantidad de proteína (mayor afinidad). A la izquierda de la imagen se indica la situación aproximada de los sitios de unión de NtcA y de los sitios de inicio de la transcripción en el  $P_{ntcA}$  (-49 y -136).



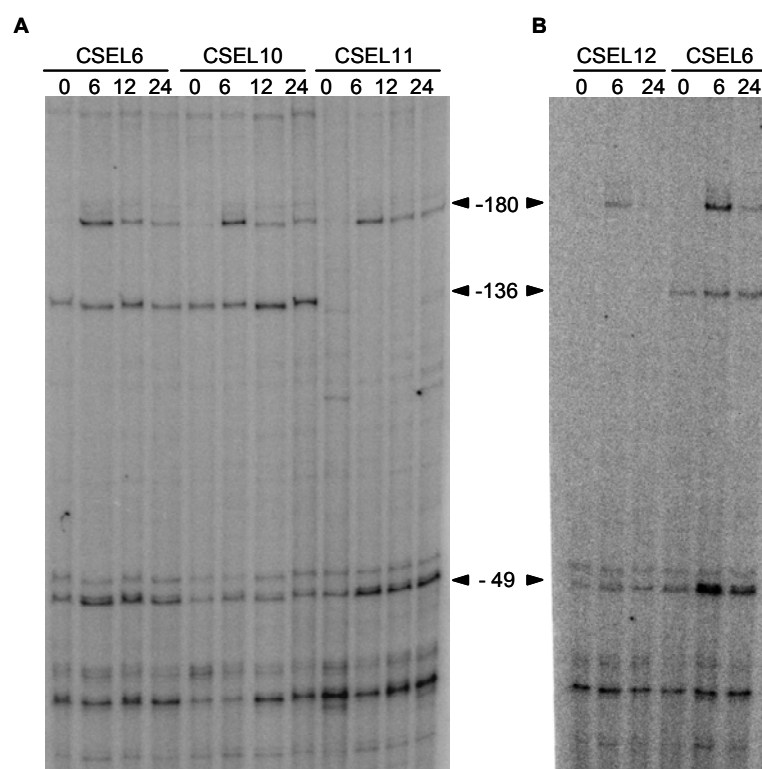
**Figura 3.28. Interpretación de los resultados obtenidos en el análisis de protección por NtcA frente a la digestión por DNasa I de fragmentos derivados del promotor de *ntcA*.** Se muestra la secuencia de nucleótidos de la región promotora de *ntcA* analizada destacándose los hemisítios de los sitios de unión de NtcA (en negrita, secuencia silvestre; en rojo, secuencia mutada), el codón de inicio de la traducción (en cursiva), los sitios de inicio de la transcripción (en azul; TSP -49, -136 y -180) y los oligonucleótidos NA14 y NA8 utilizados para la obtención de los fragmentos (subrayados). Se señalan las bandas que aparecen (triángulos huecos) y desaparecen (triángulos rellenos) así como las ventanas de protección por NtcA (líneas de colores) en el ensayo de degradación por DNasa I. Las líneas y los triángulos situados en la parte superior de la doble cadena corresponden a los resultados mostrados en la Figura 3.26 (cadena superior) y los de la parte inferior a los resultados mostrados en la Figura 3.27 (cadena inferior).

## **B. Análisis de la expresión del gen *gfp***

### Ensayo de extensión de cebador

La determinación del extremo 5' de los transcritos *gfp* en las estirpes portadoras de mutaciones en los sitios de unión de NtcA del promotor de *ntcA* se llevó a cabo mediante ensayo de extensión del oligonucleótido GFP4 (Fig. 3.22; Tabla 2.7a) con RNA aislado de filamentos creciendo con amonio o cultivados con amonio e incubados en ausencia de nitrógeno combinado durante el número de horas que se indica en cada caso (Fig. 3.29). En cada experimento se incluyó como control la estirpe CSEL6.

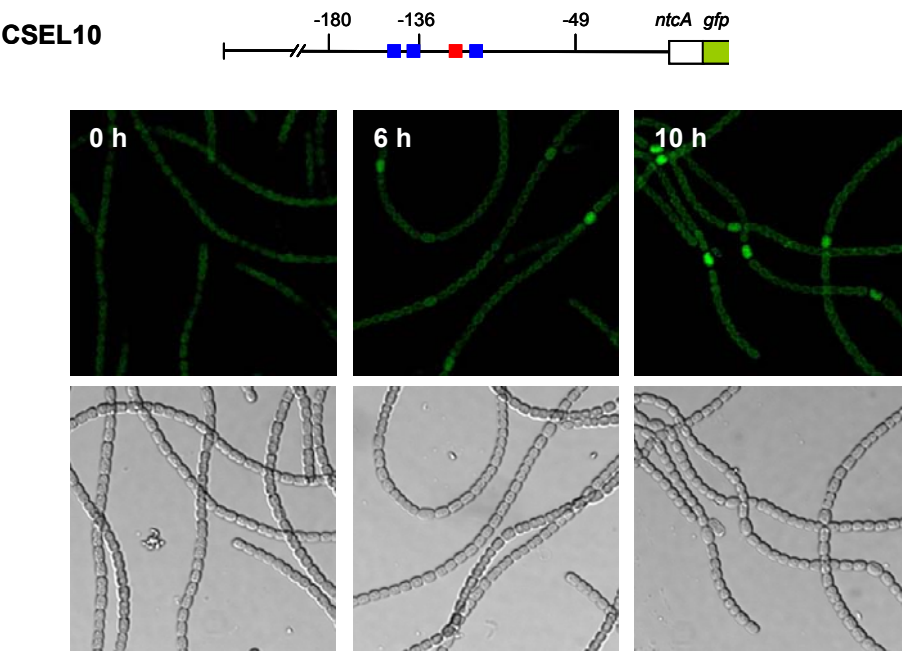
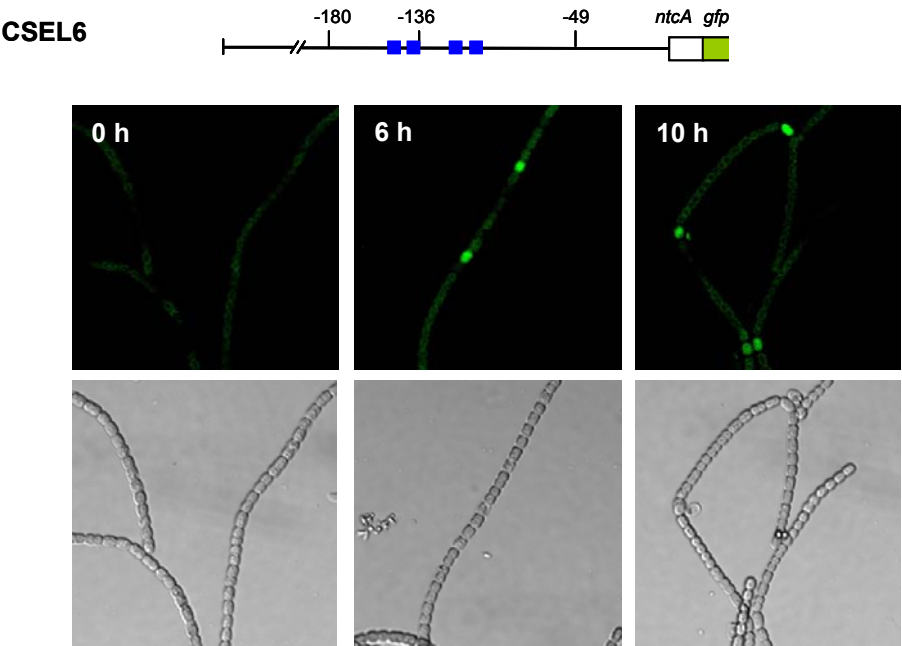
La alteración de los sitios de unión de NtcA no afectó a la aparición del transcrito originado en P<sub>3</sub> (TSP -180), que se observó en las tres estirpes mutantes en condiciones de ausencia de nitrógeno combinado. Sin embargo, la mutación del sitio proximal (estirpe CSEL10) eliminó la inducción transitoria de la expresión desde el TSP -49, de lo que se infiere que este sitio tiene un efecto positivo en la utilización del P<sub>1</sub> en condiciones de deficiencia de nitrógeno. En la estirpe CSEL10 la expresión desde el P<sub>2</sub> se veía incrementada respecto a la estirpe control, lo cual podría deberse a que la unión de NtcA al sitio proximal reprima la expresión desde el P<sub>2</sub>. En la estirpe CSEL11 no se observó expresión desde el TSP -136. Este efecto se debería al hecho de que la mutación introducida en el sitio de unión de NtcA distal cambia también la secuencia de la caja -10 (de TAN<sub>3</sub>T a ATN<sub>3</sub>T) que precede al TSP -136. La expresión desde el TSP -49 en la estirpe CSEL11 resultó ser alta en los filamentos incubados en deficiencia de nitrógeno al menos hasta las 24 h de inducción. En la estirpe CSEL12 se observaba expresión basal desde el TSP -49, lo que confirma que el componente no inducible de la expresión desde -49 es independiente de NtcA (Muro-Pastor *et al.*, 2002). Por otra parte, la expresión del TSP -180 en CSEL12 resultó ser, por motivos que desconocemos, sensiblemente más baja que la observada en la estirpe control CSEL6 o las estirpes CSEL10 y CSEL11 (Fig. 3.29).



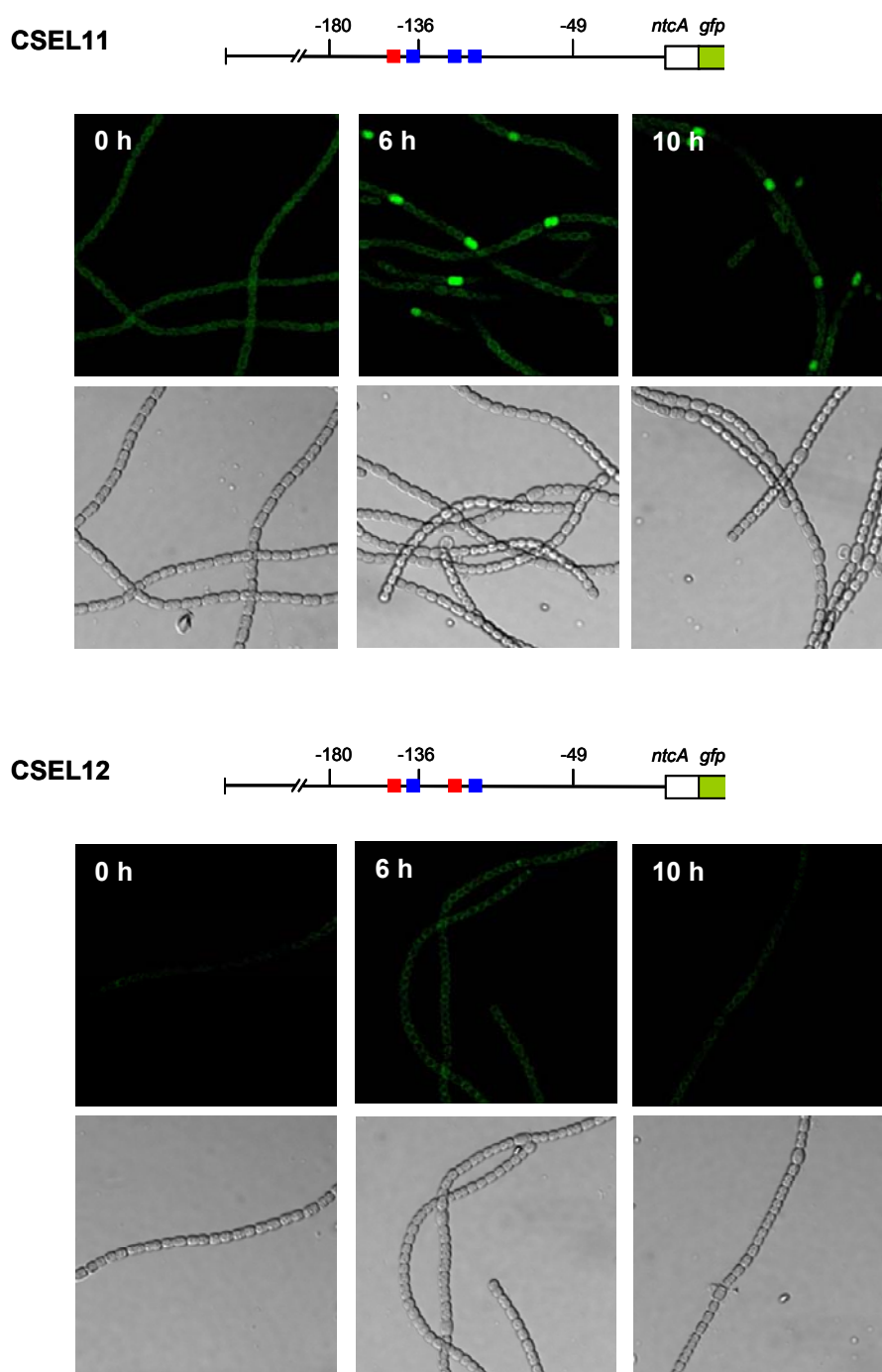
**Figura 3.29. Determinación de los sitios de inicio de la transcripción del gen *gfp* en las estirpes CSEL10, CSEL11 y CSEL12.** Ensayos de extensión del cebador GFP4 (Fig. 3.22) utilizando RNA aislado de filamentos de las estirpes CSEL6 (control), CSEL10, CSEL11 y CSEL12 creciendo con amonio (0 h) o cultivados con amonio e incubados durante el tiempo indicado en ausencia de nitrógeno combinado. Los ensayos se realizaron con 25 µg de RNA (A) o con 13 µg de RNA (B). Los triángulos indican las posiciones correspondientes a los TSPs del promotor de *ntcA* (-49, -136 y -180).

### C. Análisis de la expresión de la proteína GFP

La emisión de fluorescencia de la proteína GFP se analizó en filamentos creciendo con amonio o cultivados con amonio e incubados 6, 10 ó 24 h en ausencia de nitrógeno combinado (Fig. 3.30) según se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.9). No se observó expresión localizada cuando el gen *gfp* estaba bajo la dirección de una versión del promotor de *ntcA* con los dos sitios de unión mutados (estirpe CSEL12). Las estirpes que tenían mutado un único sitio de unión de NtcA mostraron un comportamiento similar al de la estirpe control CSEL6, presentando una fluorescencia mayor en células localizadas (proheterocistos) respecto a las células adyacentes en deficiencia de nitrógeno. Los resultados obtenidos indican que para el incremento de la expresión de GFP en células concretas durante el proceso de diferenciación de heterocistos es necesaria y suficiente la presencia de uno de los dos sitios de unión de NtcA descritos.







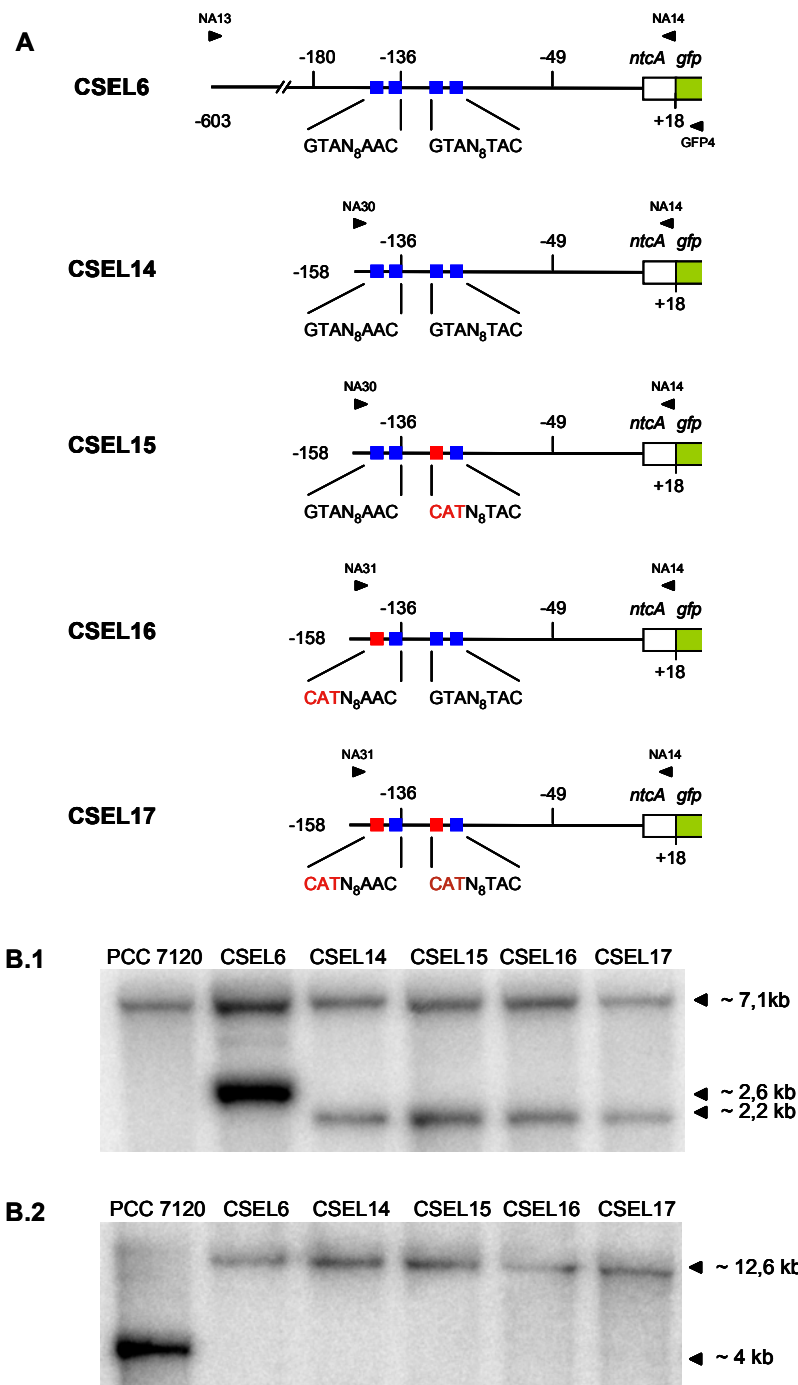
**Figura 3.30. Fluorescencia de la proteína GFP en las estirpes CSEL10, CSEL11 y CSEL12.** Se muestra la fluorescencia de la proteína GFP y la imagen en campo claro de filamentos de las estirpes CSEL6 (control), CSEL10, CSEL11 y CSEL12 creciendo con amonio (0 h) o cultivados con amonio e incubados durante 6 ó 10 h en ausencia de nitrógeno combinado. Para cada estirpe se muestra el esquema de la versión de  $P_{ntcA}$  fusionado al gen *gfp* que se esté analizando, la situación aproximada de los TSPs (-49, -136 y -180) y los sitios de unión de NtcA (en azul las secuencias silvestres y en rojo las secuencias mutadas).

### 3.2.2.4. Análisis de la expresión desde el TSP -49 en ausencia de expresión desde el TSP -180

Los resultados obtenidos del análisis de la expresión de la proteína GFP desde versiones delecionadas de  $P_{ntcA}$  (apartado 3.2.2.2B) indicaron que el  $P_3$  es necesario para el incremento localizado de la fluorescencia durante el desarrollo de los heterocistos (estirpe CSEL7). Sin embargo, la expresión desde el TSP -49, con un fragmento de promotor que contiene el sitio proximal de unión de NtcA (estirpe CSEL8), es suficiente para que se observe localización de la proteína GFP en los heterocistos en desarrollo. Se planteó el estudio del requerimiento del promotor  $P_1$  en la expresión de *ntcA* durante el proceso de diferenciación de los heterocistos en ausencia de expresión desde el TSP -180. Para ello, una versión del promotor de *ntcA* ( $P_{ntcA}^*$ ) delecionado por la posición -158 que contenía los dos sitios de unión de NtcA (Fig. 3.31A), producto de PCR con los oligonucleótidos NA14 y NA30 (Tabla 2.7a) y el plásmido pCSEL18 como molde (Tabla 2.5), se fusionó traduccionalmente al gen *gfp* siguiendo la estrategia descrita en el apartado 3.2.2.1A. La estirpe obtenida, denominada CSEL14, se utilizaría como control de los mutantes que portaban versiones similares del  $P_{ntcA}^*$  pero con alteración en la secuencia de los sitios de unión de NtcA: estirpe CSEL15, mutación del sitio proximal (de GTAN<sub>8</sub>TAC a CATN<sub>8</sub>TAC); estirpe CSEL16, mutación del sitio distal (de GTAN<sub>8</sub>AAC a CATN<sub>8</sub>AAC); estirpe CSEL17, mutación en ambos sitios (Fig. 3.31A). Para la mutagénesis dirigida del sitio de unión proximal, se amplificó por PCR el fragmento correspondiente utilizando como molde el plásmido pCSEL35 (Tabla 2.5) y los oligonucleótidos NA14 y NA30 (Tabla 2.7a; Fig. 3.31A). El fragmento que contenía alterada la secuencia en el sitio distal se obtuvo mediante PCR con el plásmido pCSEL44 como molde (Tabla 2.5) y los oligonucleótidos NA31 y NA14 (Tabla 2.7a; Fig. 3.31A). Por último, se utilizó el plásmido pCSEL47 (Tabla 2.5) y los oligonucleótidos NA31 y NA14 para amplificar la región promotora de NtcA con alteración de secuencia en los dos sitios de unión de NtcA.

El estudio, mediante análisis de Southern realizado según se describe en el apartado 3.2.2.1B, de la estructura genómica de las estirpes CSEL14, CSEL15, CSEL16 y CSEL17 confirmó la segregación e integración de las fusiones  $P_{ntcA}^*$ -*gfp* en la plataforma *nucA* (Fig. 3.31B).





**Figura 3.31. Representación esquemática de la fusión traduccional del gen testigo *gfp* con versiones del promotor de *ntcA* carentes de  $P_3$  y que portan mutaciones en los sitios de unión de NtcA (A) y análisis de la estructura genómica y segregación de las estirpes mutantes CSEL14, CSEL15, CSEL16 y CSEL17 (B).** (A) Los cuadrados azules indican los dos hemisitos que conforman el sitio de unión de NtcA separados por 8 pb. Las mutaciones introducidas se señalan en rojo. Se indica la posición aproximada de los TSPs de  $P_{ntcA}$  (-49, -136 y -180) y de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los fragmentos (triángulos negros). También se indica la posición del oligonucleótido utilizado en el ensayo de extensión de cebador (GFP4). La estructura genómica de las estirpes portadoras de la fusión  $P_{ntcA}^*-gfp$  (B.1) y el grado de segregación (B.2) se estudiaron mediante análisis de Southern. El DNA genómico se digirió con *EcoR* V y se hibridó con una sonda de la región promotora de *ntcA* (B.1), o se digirió con *Sca* I y se hibridó con una sonda de la región *nucA* (B.2) (ver Fig. 3.17). A la derecha de la imagen se indica el tamaño de las bandas esperadas (ver Fig. 3.17).

### A. Análisis de la expresión del gen *gfp*

#### Ensayo de extensión de cebador

Se realizaron ensayos de extensión del cebador GFP4 (apartado 2.3.5) (Tabla 2.7a; Fig. 3.31A) utilizando RNA aislado de filamentos creciendo con amonio (0 h), o cultivados con amonio e incubados 9 h sin nitrógeno combinado, para determinar el extremo 5' de los transcritos del gen *gfp* generados en cada una de las estirpes mutantes CSEL14, CSEL15, CSEL16 y CSEL17 (Fig. 3.32). Se utilizó como control la estirpe CSEL6.

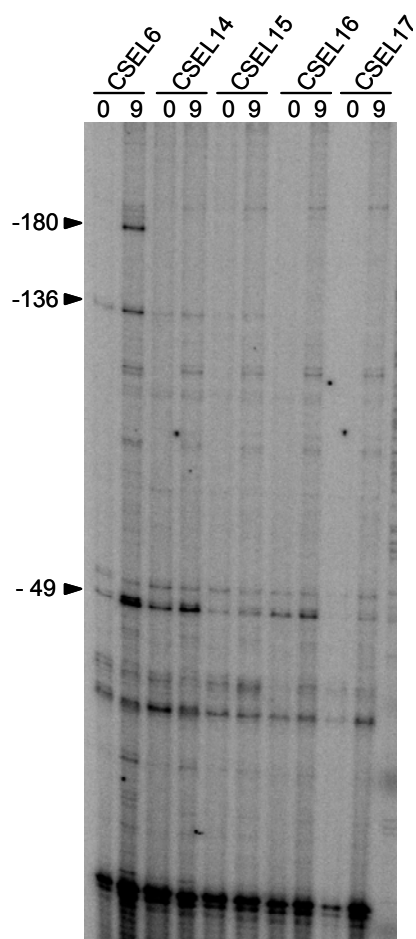
Como se esperaba, en ninguna de las estirpes mutantes había transcrito desde el TSP -180. Los resultados obtenidos mostraron que la delección de  $P_{ntcA}$  por la posición -158 apenas afectaba al funcionamiento del  $P_1$  (Fig. 3.32, CSEL14). Dado que la eliminación del fragmento anterior a la posición -158 elimina secuencias correspondientes al  $P_2$ , se esperaba que no hubiera expresión desde el TSP -136. Sin embargo, sí se observaba transcrito aunque en cantidad muy inferior a la de la estirpe control (Fig. 3.32, CSEL14 y CSEL15). Esta expresión residual desaparecía en las estirpes CSEL16 y CSEL17, en las que la secuencia de la caja -10 del  $P_2$  está alterada como consecuencia de la mutación del sitio distal [ver estirpes CSEL11 (Fig. 3.29) y CSEL16 (Fig. 3.32)]. Todos los mutantes presentaban expresión basal desde el TSP -49, pero en aquellos en los que la secuencia del sitio de unión de NtcA proximal estaba alterada (estirpes CSEL15 y CSEL17) el incremento de expresión a las 9 h en ausencia de nitrógeno combinado estaba muy disminuido.

### B. Análisis de la expresión de la proteína GFP

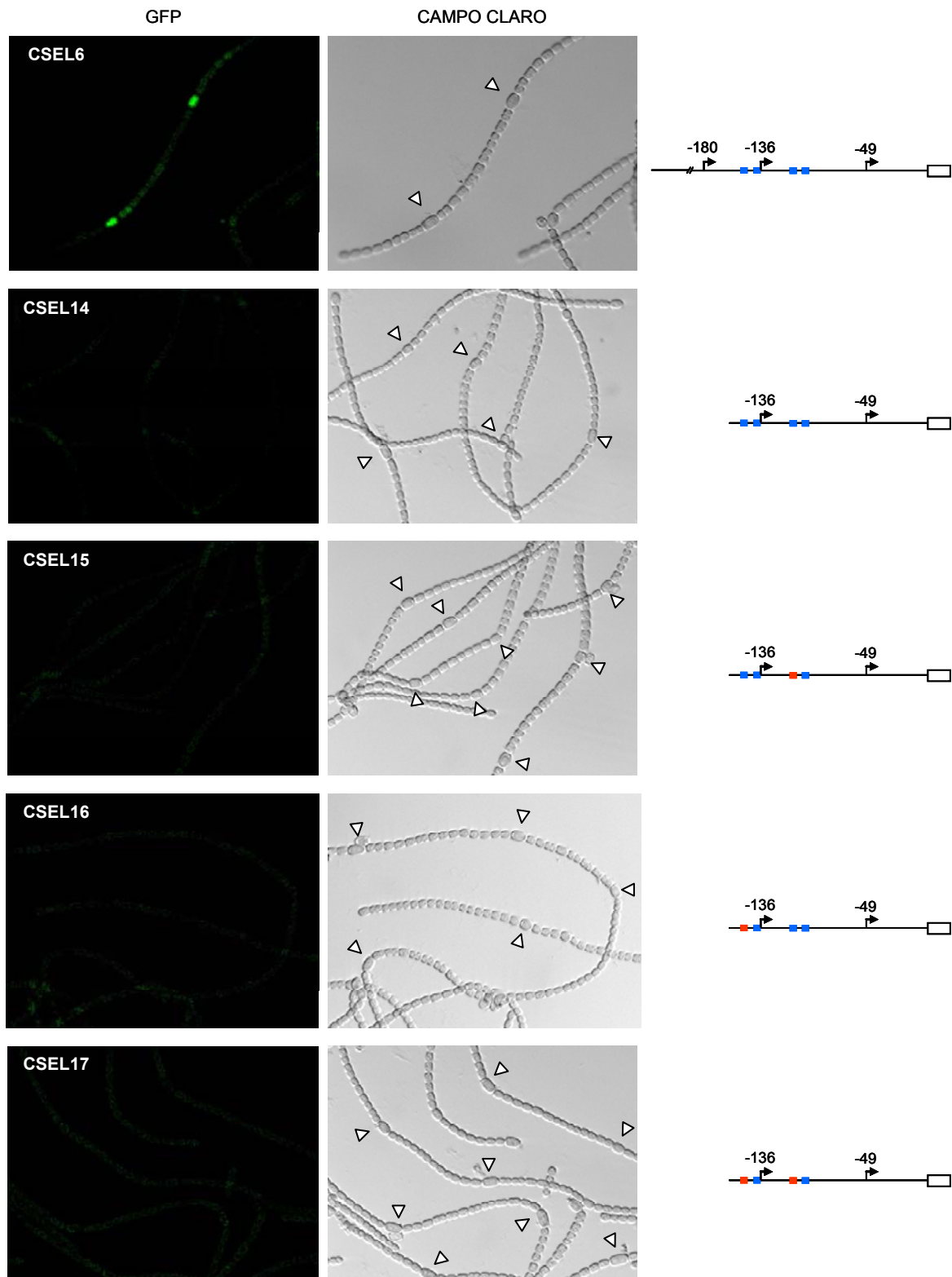
Se llevó a cabo el análisis de fluorescencia de la proteína GFP en filamentos cultivados con amonio o creciendo con amonio e incubados 6, 12 ó 24 h en ausencia de nitrógeno combinado. En la estirpe control, CSEL6, se observó un incremento de la proteína GFP en los proheterocistos a las 6 y 12 h en deficiencia de nitrógeno combinado; sin embargo, en las estirpes mutantes no se apreció fluorescencia GFP en células concretas ni tampoco un incremento en todo el filamento tras el paso del cultivo a medio sin nitrógeno. En la Figura 3.33 se muestra la imagen correspondiente a 12 h sin nitrógeno combinado.

Dado que el experimento de extensión del cebador GFP4 mostró la existencia de transcrito *gfp* en las estirpes mutantes (Fig. 3.32), se esperaba ver fluorescencia GFP. Se planteó entonces la posibilidad de que el gen *gfp* clonado presentara alguna alteración de secuencia de forma que pudiera estar afectada la conformación de la proteína GFP. Para comprobar esta hipótesis, se amplificó por PCR el gen *gfp* a partir de DNA genómico aislado de las estirpes mutantes CSEL6 y CSEL14 con los oligonucleótidos NA4 y pBR322 (Tabla 2.7a; Fig. 3.17). La secuenciación del producto de PCR obtenido mostró que la secuencia del gen *gfp* presente en las estirpes analizadas era idéntica, correspondía al gen *gfp-mut2* y no contenía ninguna mutación que pudiera explicar la

ausencia de fluorescencia en estas estirpes. Por lo tanto, parece que la cantidad de transcrito generado en las mismas era insuficiente para producir una cantidad de GFP detectable por fluorescencia en nuestras condiciones experimentales.



**Figura 3.32. Determinación de los sitios de inicio de la transcripción del gen *gfp* en las estirpes CSEL14, CSEL15, CSEL16 y CSEL17.** Ensayos de extensión del cebador GFP4 (Fig. 3.31A) utilizando 25 µg de RNA aislado de filamentos de las estirpes CSEL6 (control), CSEL14, CSEL15, CSEL16 y CSEL17 creciendo con amonio (0 h), o cultivados con amonio y lavados e incubados durante 9 h sin nitrógeno combinado. Los triángulos indican las posiciones de los TSPs del promotor de *ntcA* (-49, -136 y -180).



**Figura 3.33. Fluorescencia de la proteína GFP en las estirpes CSEL14, CSEL15, CSEL16 y CSEL17.** Fluorescencia de la proteína GFP (izquierda) e imagen en campo claro (derecha) de filamentos de las estirpes CSEL6 (control), CSEL14, CSEL15, CSEL16 y CSEL17 cultivados con amonio e incubados durante 12 h en ausencia de nitrógeno combinado. Con triángulos se señalan los proheterocistos. Se muestra el esquema de la versión del promotor de *ntcA* fusionado al gen *gfp* que se esté analizando, y la situación aproximada de los TSPs de *ntcA* (-49, -136 y -180) y de los sitios de unión de NtcA (en azul las secuencias silvestres y en rojo las secuencias mutadas).

### 3.3. BÚSQUEDA DE POSIBLES ELEMENTOS REGULADORES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LOS HETEROCISTOS

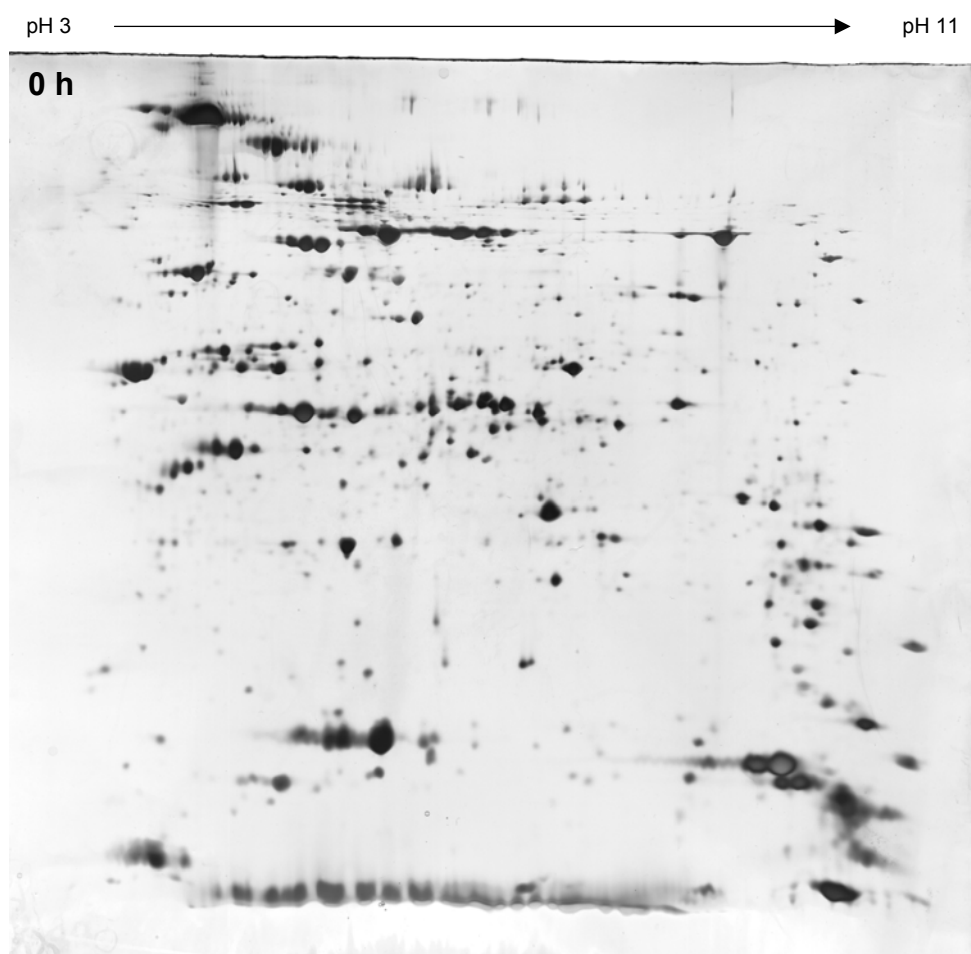
El desarrollo de filamentos con heterocistos supone un gran cambio en el patrón de expresión génica en las células que se encuentran en diferenciación respecto a las células vegetativas. Múltiples factores del proceso de diferenciación han sido ya identificados utilizando diferentes acercamientos experimentales como la mutagénesis química, mutagénesis con luz UV (Wolk *et al.*, 1988; Buikema y Haselkorn, 1991a) o mutagénesis por transposón (Borthakur y Haselkorn, 1989; Wolk *et al.*, 1991; Ernst *et al.*, 1992; Fan *et al.*, 2006). Ehira *et al.* (2003; 2006a) llevaron a cabo un análisis global del transcriptoma (conjunto de genes expresados) de *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante análisis por “microarray” con RNA aislado de filamentos creciendo con nitrato e incubados sin nitrógeno combinado durante 3, 8 ó 24 horas, lo que ha permitido la identificación de una serie de elementos que podrían estar implicados en el proceso de diferenciación celular y la fijación del nitrógeno atmosférico (Xu *et al.*, 2008). Por otro lado, en los últimos años se han llevado a cabo acercamientos que hacen uso de técnicas de proteómica (Sazuka *et al.*, 2003; Moslavac *et al.*, 2005; Stensjö *et al.*, 2007) debido a las mejoras en las técnicas de identificación de proteínas, lo que en el caso de *Anabaena* se ha visto facilitado por la disponibilidad del genoma secuenciado (Kaneko *et al.*, 2001). El objetivo de esta parte del trabajo ha sido la búsqueda de posibles factores reguladores del desarrollo de los heterocistos utilizando un acercamiento proteómico.

#### 3.3.1. ANÁLISIS DEL SUBPROTEOMA QUE PRESENTA AFINIDAD POR HEPARINA DE CÉLULAS DE *Anabaena* sp. PCC 7120 SOMETIDAS A DEFICIENCIA EN NITRÓGENO

La búsqueda de factores potencialmente implicados en la regulación del desarrollo de los heterocistos se abordó mediante el análisis comparativo de proteínas de filamentos incubados en presencia de nitrógeno combinado o cultivados con amonio e incubados 3, 6, 9 ó 24 h en ausencia de nitrógeno combinado. Dado que las proteínas reguladoras conforman una fracción mínima del proteoma celular, su análisis mediante electroforesis bidimensional se ve dificultado por la presencia de otras proteínas más abundantes. Con objeto de reducir la complejidad de las muestras analizadas, se llevó a cabo el fraccionamiento del proteoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante cromatografía de afinidad por heparina, matriz con la que interaccionarían preferentemente las proteínas que se unen a los ácidos nucleicos, según se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.4.3). Las proteínas con afinidad por heparina de cada condición de cultivo se sometieron a separación según su punto isoelectrico y su peso molecular mediante electroforesis bidimensional

## Resultados

en geles de poliacrilamida y se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata (Fig. 3.34). Se realizó un análisis comparativo del patrón de proteínas obtenido en cada condición de cultivo, y para cada tiempo de deficiencia (3, 6, 9 ó 24 h) se seleccionaron aquellas proteínas cuya cantidad aumentaba respecto a la muestra de amonio. Cuando una mancha de interés para nuestro estudio aparecía en más de un tiempo de deficiencia sólo se analizaba una vez. Las manchas seleccionadas se sometieron a análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5.



**Figura 3.34. Electroforesis bidimensional de las proteínas con afinidad por heparina de *Anabaena* sp. PCC 7120.** Se utilizaron muestras de filamentos creciendo con amonio (0 h) o cultivados con amonio e incubados 3, 6, 9 ó 24 h en deficiencia de nitrógeno combinado. Las muestras (100 µg de proteína) se sometieron a separación según su pI en un gradiente no lineal inmovilizado de pH 3-11 (tiras de 18 cm) y, según su peso molecular en geles desnaturizantes de SDS-poliacrilamida al 12,5 %. Las proteínas se tiñeron con nitrato de plata.

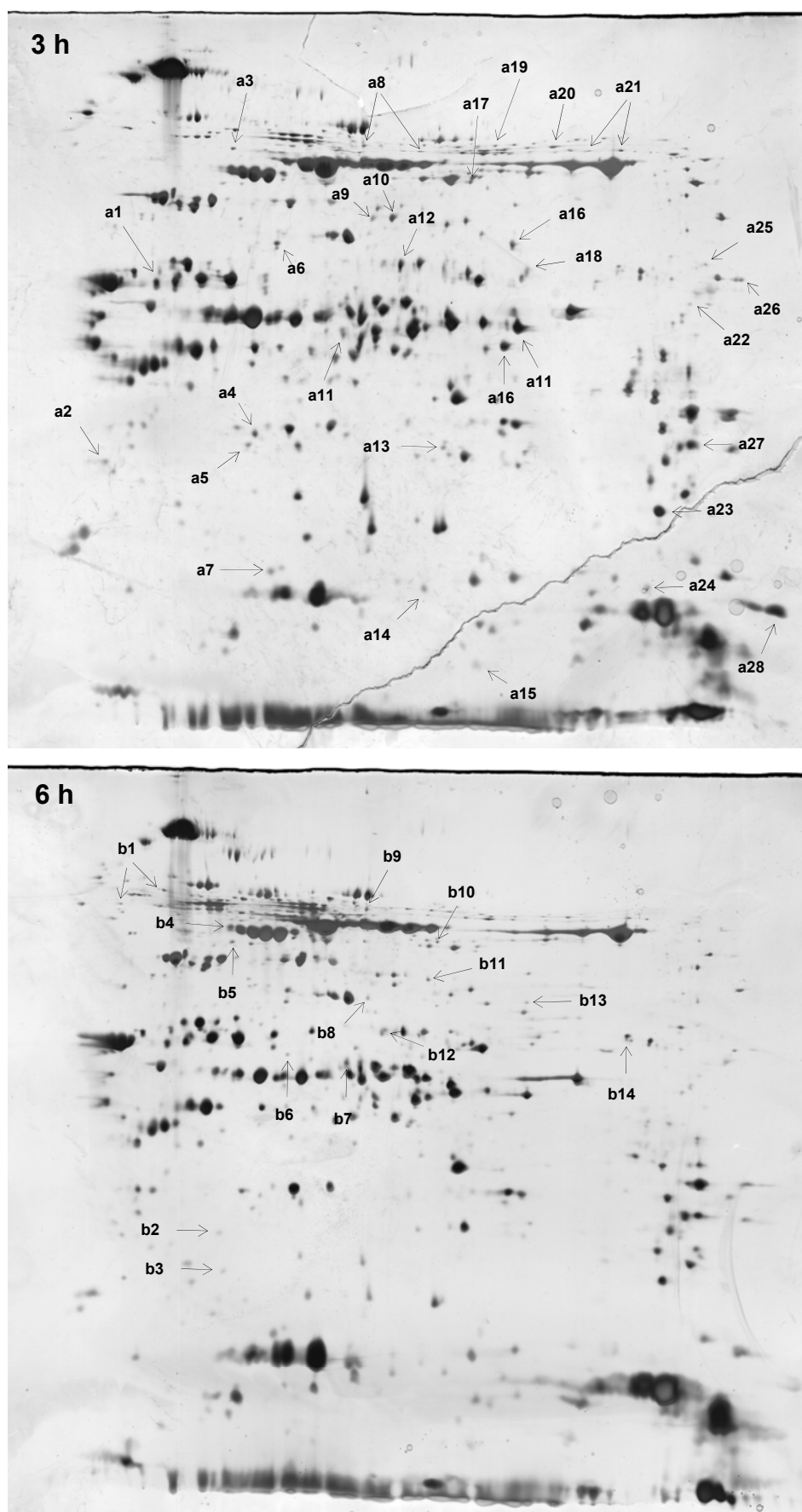


Figura 3.34. Electroforesis bidimensional de las proteínas con afinidad por heparina de *Anabaena* sp. PCC 7120. (Continuación)

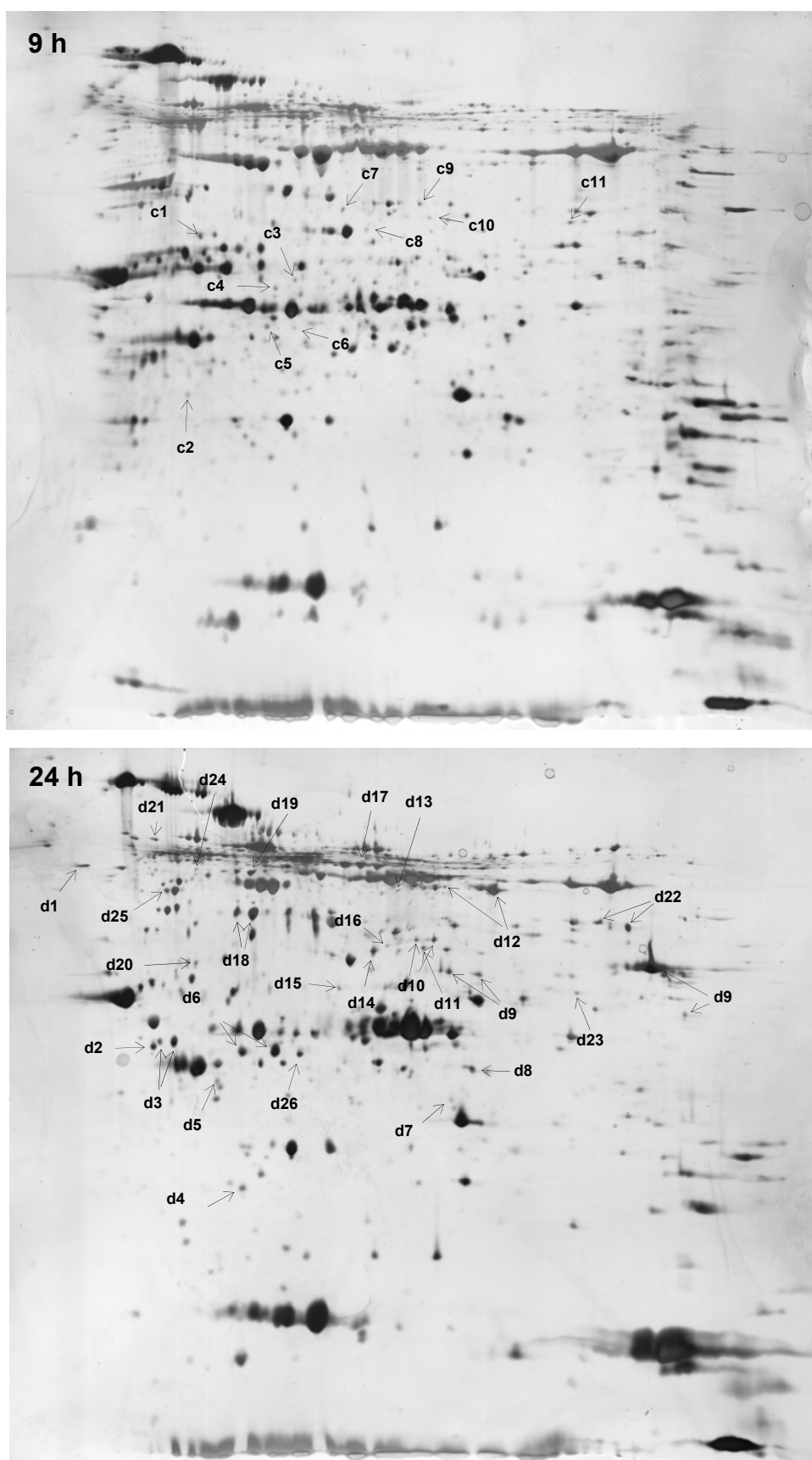


Figura 3.34. Electroforesis bidimensional de las proteínas con afinidad por heparina de *Anabaena* sp. PCC 7120. (Continuación).



Dado que las subunidades del complejo de la RNA polimerasa están muy representadas en el subproteoma de afinidad por heparina, en el análisis realizado se obtuvieron múltiples manchas correspondientes a fragmentos de dichas subunidades, que no se señalan. Aquellas proteínas identificadas como “hipotéticas” o “desconocidas” en la anotación del genomio de *Anabaena* (Kaneko *et al.*, 2001) se agrupan en nuestras tablas como “proteínas de función desconocida”.

**Tabla 3.2. Proteínas con afinidad por heparina correspondientes a filamentos cultivados con amonio e incubados 3 h en deficiencia de nitrógeno combinado identificadas mediante espectrometría de masas.** Estas proteínas, correspondientes a las manchas señaladas en la Fig. 3.34 (3 h), son aquellas que no se detectaban en la muestra de amonio (Fig. 3.34, 0 h), o cuya intensidad aumentaba con respecto a aquella.

Mancha <sup>a</sup>	Gen <sup>b</sup>	Identidad y/o posible función <sup>c</sup>	Mascot score <sup>d</sup>	PM Teórico (KDa)	pI Teórico	Péptidos identificados	% Cobertura
a1	<i>alr1700</i>	Desconocida	155	37	8,1	9	33
a2	<i>alr4404</i>	Proteína de la familia AhpC/TSA	66	24			
a3	<i>alr1254</i>	DNA polimerasa I	145	109	5	14	16
a4	<i>alr0585</i>	Posible glicosiltransferasa	151	38	6,4	9	26
a5	<i>alr1301</i>	Desconocida	141	25	5,3	8	20
a6	<i>alr0335 (thrS)</i>	Treonil-tRNA sintetasa	176	71	5,4	13	20
a7	<i>alr1207</i>	Uridilato quinasa	170	26		6	
a8	<i>alr3716 (uvrA)</i>	Excinclease ABC, subunidad A	122	107	5,9	10	12
a9	<i>alr1524 (rbcL)</i>	Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa, subunidad grande	284	53	6,2	19	36
a10	<i>alr1524 (rbcL)</i>	Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa, subunidad grande	139	53	6,2	8	22
a11	<i>alr1562</i>	Desconocida	117	38	6,4	7	19
a12	<i>all4252</i>	Posible óxido-reductasa	194	42	6,3	12	34
a13	<i>all4144</i>	Desconocida	124	24	6,4	6	30
a14	<i>alr3952</i>	Proteína de unión a DNA DevH	131	27	8,2	6	26
a15	<i>alr0237</i>	Leucina aminopeptidasa	82	52			
a16	<i>alr4331</i>	Ribonucleasa E	197	76	5,5	14	20
a17	<i>all1875</i>	Desconocida	221	58	6,2	14	24
a18	<i>alr3425</i>	Posible glicosiltransferasa	136	44	7	7	26
a19	<i>alr2780</i>	DNA topoisomerasa I	123	97	7,5	9	11
a20	<i>all4248</i>	Proteína PriA de la replicación del DNA	363	95	6,7	24	33
a21	<i>all2004</i>	ATPasa transportadora de cationes	156	83	7,3	10	12
a22	<i>alr1901</i>	Ciclasa de fosfato terminal 3' de RNA	101	37	8,1	6	26
a23	<i>all4623 (infC)</i>	Factor de iniciación de la traducción IF-3	235	21	8,3	12	61
a24	<i>all0147 (rplL21)</i>	Proteína ribosómica 50S L21	185	14		6	
a25	<i>all4294</i>	Probable N-acetilmuramoi-L-alanina amidasa (proteína que se une al peptidoglicano)	128	56	8,7	9	25
a26	<i>all4343</i>	Desconocida	196	72	8,8	13	28
a27	<i>all0844</i>	Peptidil-tRNA hidrolasa	220	22	8,5	10	40
a28	<i>all4199</i>	Proteína ribosómica S5	157	18	9,2	9	59

<sup>a</sup> Identificación de la mancha en el gel. <sup>b</sup> Gen al que corresponde la proteína identificada mediante espectrometría de masas. <sup>c</sup> Posible identidad o función de la proteína según la anotación de Kaneko *et al.* (2001) (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase>). <sup>d</sup> Valor que indica la probabilidad de que la identificación obtenida sea un evento al azar (valores por encima de 76 se consideran identificaciones fiables).

## Resultados

**Tabla 3.3. Proteínas con afinidad por heparina correspondientes a filamentos cultivados con amonio e incubados 6 h en deficiencia de nitrógeno combinado identificadas mediante espectrometría de masas.** Estas proteínas, correspondientes a las manchas señaladas en la Fig. 3.34 (6 h), son aquellas que no se detectaban en la muestra de amonio (Fig. 3.34, 0 h), o cuya intensidad aumentaba con respecto a aquella.

Mancha <sup>a</sup>	Gen <sup>b</sup>	Identidad y/o posible función <sup>c</sup>	Mascot score <sup>d</sup>	PM Teórico (KDa)	pI Teórico	Péptidos identificados	% Cobertura
b1	<i>alr1254</i>	DNA polimerasa I	104	109	5	8	10
b2	<i>all1076</i>	PlmA, proteína reguladora de la familia de GntR	110	36	5,2	6	25
b3	<i>all0005</i>	ATP sintetasa tipo F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> , subunidad $\alpha$	166	55		5	
b4	<i>alr0335</i>	Treonil-tRNA sintetasa	203	71	5,4	13	25
b5	<i>alr1240</i>	Proteína Zam	109	88		5	
b6	<i>all5012</i>	Histidil-tRNA sintetasa	188	52	5,2	11	27
b7	<i>alr4149</i>	Biliverdina reductasa	197	36	5,7	14	20
b7	<i>all5062 (gap2)</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa		37	6,1		28
b8	<i>alr2725</i>	Deoxirribopirimidina fotoliasa	163	55	5,9	11	25
b9	<i>alr3716 (uvrA)</i>	Excinucleasa ABC, subunidad A	90	107	5,9	7	9
b10	<i>alr4877</i>	Desconocida. Tiene dominios WD-40	119	67		4	
b11	<i>all1872</i>	Desconocida	155	57	6	10	19
b12	<i>all4252</i>	Posible óxido-reductasa	121	42		9	
b13	<i>all3989</i>	PoliA polimerasa	89	101	6,4	7	9
b14	<i>alr1209</i>	Desconocida	195	41	7,6	11	29

<sup>a</sup> Identificación de la mancha en el gel. <sup>b</sup> Gen al que corresponde la proteína identificada mediante espectrometría de masas. <sup>c</sup> Posible identidad o función de la proteína según la anotación de Kaneko *et al.* (2001) (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase>). <sup>d</sup> Valor que indica la probabilidad de que la identificación obtenida sea un evento al azar (valores por encima de 76 se consideran identificaciones fiables).

**Tabla 3.4. Proteínas con afinidad por heparina correspondientes a filamentos cultivados con amonio e incubados 9 h en deficiencia de nitrógeno combinado identificadas mediante espectrometría de masas.** Estas proteínas, correspondientes a las manchas señaladas en la Fig. 3.34 (9 h), son aquellas que no se detectaban en la muestra de amonio (Fig. 3.34, 0 h), o cuya intensidad aumentaba con respecto a aquella.

Mancha <sup>a</sup>	Gen <sup>b</sup>	Identidad y/o posible función <sup>c</sup>	Mascot score <sup>d</sup>	PM Teórico (KDa)	pI Teórico	Péptidos identificados	% Cobertura
c1	<i>all4337 (tufA)</i>	Factor de elongación de la traducción EF-Tu	96	45	5,1	6	18
c2	<i>all3964</i>	Fosfoglucomutasa/fosfomanomutasa	121	52	5	8	18
c3	<i>alr0939 (accA)</i>	Biotina carboxilasa	110	49	5,9	7	16
c4	<i>all5012 (hisS)</i>	Histidil-tRNA sintetasa	102	52	5,2	6	17
c5	<i>all3953</i>	Regulador transcripcional homólogo a RbcR	161	38	5,4	9	24
c6	<i>all0122</i>	Piruvato deshidrogenasa E1, subunidad $\beta$	160	36	5,5	9	38
c7	<i>alr1827 (icd)</i>	Isocitrato deshidrogenasa (NADP <sup>+</sup> )	119	52	5,8	8	19
c8	<i>alr2725</i>	Deoxirribopirimidina fotoliasa	133	55	5,9	9	21
c9	<i>all1872</i>	Desconocida	131	57	6	9	22
c10	<i>alr3921</i>	UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa	110	49	6,3	7	15
c11	<i>all1692 (sigC)</i>	SigC, subunidad $\sigma$ RNA polimerasa	149	47	6	6	

<sup>a</sup> Identificación de la mancha en el gel. <sup>b</sup> Gen al que corresponde la proteína identificada mediante espectrometría de masas. <sup>c</sup> Posible identidad o función de la proteína según la anotación de Kaneko *et al.* (2001) (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase>). <sup>d</sup> Valor que indica la probabilidad de que la identificación obtenida sea un evento al azar (valores por encima de 76 se consideran identificaciones fiables).

**Tabla 3.5. Proteínas con afinidad por heparina correspondientes a filamentos cultivados con amonio e incubados 24 h en deficiencia de nitrógeno combinado identificadas mediante espectrometría de masas.** Estas proteínas, correspondientes a las manchas señaladas en la Fig. 3.34 (24 h), son aquellas que no se detectaban en la muestra de amonio (Fig. 3.34, 0 h), o cuya intensidad aumentaba con respecto a aquella.

Mancha <sup>a</sup>	Gen <sup>b</sup>	Identidad y/o posible función <sup>c</sup>	Mascot score <sup>d</sup>	PM Teórico (KDa)	pI Teórico	Péptidos identificados	% Cobertura
d1	<i>all7185</i>	Desconocida	83	52	4,3	6	11
d2	<i>all1239</i>	Desconocida	178	30	4,8	9	45
d3	<i>alr2708</i>	Deshidrogenasa, componente E1	125	38	4,9	8	21
d4	<i>alr1238 (clpP)</i>	Proteasa Clp dependiente de ATP, subunidad proteolítica	122	23	5,4	7	39
d5	<i>all1455 (nifH)</i>	Dinitrogenasa reductasa	129	32	4,8	7	26
d6	<i>all3953</i>	Regulador transcripcional homólogo a RbcR	298	38	5,4	17	47
d7	<i>all1221 (btpA)</i>	Proteína A de biogénesis del tilacoide	158	30	6,4	9	34
d8	<i>alr1008</i>	Desconocida	102	36			
d9	<i>alr1700</i>	Desconocida	138	37	8,1	8	28
d10	<i>alr3921</i>	UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa	179	49	6,3	11	23
d11	<i>alr4571</i>	Proteína de división celular inhibible por glucosa	104	48	6,3	6	16
d12	<i>all3678</i>	Desconocida	145	66	6,8	9	19
d13	<i>alr4331</i>	Ribonucleasa E	134	76	5,5	9	15
d14	<i>alr1798 (queA)</i>	S-adenosilmetionina:tRNA ribosiltransferasa-isomerasa	108	44	5,9	5	17
d15	<i>all4092</i>	Desconocida	177	40		3	
d16	<i>alr0939 (accA)</i>	Biotina carboxilasa	128	49	5,9	8	21
d17	<i>all5265</i>	DNA girasa, subunidad B	431	72	5,9	23	33
d17	<i>alr3593</i>	Polifosfato quinasa		84	5,9	10	16
d18	<i>all1440 (nifK)</i>	Dinitrogenasa subunidad $\beta$	197	58	5,3	13	26
d19	<i>all1782</i>	Desconocida	221	67	5,2	13	30
d20	<i>alr1810</i>	Desconocida	139	38		4	
d21	<i>alr4851 (secA)</i>	Subunidad del sistema Sec de translocación de proteínas	114	106	4,8	8	13
d22	<i>all1454 (nifD)</i>	Dinitrogenasa subunidad $\alpha$	111	55	6,7	8	19
d23	<i>alr7083</i>	Proteína de la familia ParB de segregación de cromosoma	136	41	7,5	8	23
d24	<i>alr3832 (infB)</i>	Factor de iniciación de la traducción IF-2	101	112		5	
d25	<i>all1338</i>	Desconocida	115	48	4,7	7	25
d26	<i>all0122</i>	Piruvato deshidrogenasa E1, subunidad $\beta$	221	36	5,5	12	45

<sup>a</sup> Identificación de la mancha en el gel. <sup>b</sup> Gen al que corresponde la proteína identificada mediante espectrometría de masas. <sup>c</sup> Posible identidad o función de la proteína según la anotación de Kaneko *et al.* (2001) (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase>). <sup>d</sup> Valor que indica la probabilidad de que la identificación obtenida sea un evento al azar (valores por encima de 76 se consideran identificaciones fiables).

Los resultados recogidos en las Tablas 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5 incluyen proteínas que están implicadas en la replicación del DNA (DNA girasa, DNA polimerasa, DNA topoisomerasa, etc.) o en la traducción de proteínas (como por ejemplo algunas subunidades de los ribosomas, sintetasas de tRNAs o factores de iniciación o de elongación). También se identificaron una serie de proteínas

reguladoras (DevH, PlmA) o potencialmente reguladoras de la expresión génica (All1338, All3953). Todas estas proteínas de interacción con ácidos nucleicos son del tipo de proteínas que se espera que interaccionen con la matriz de heparina. Sin embargo, también hay proteínas cuya afinidad por la matriz de heparina podría deberse a una interacción con disacáridos (probable N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa, fosfoglucomutasa/fosfomanomutasa, etc.). Por otra parte, se han obtenido una serie de proteínas cuya participación en el desarrollo de los heterocistos (DevH) o cuya expresión localizada en las células que se están diferenciando (SigC) se ha descrito anteriormente (Hebbar y Curtis, 2000; Aldea *et al.*, 2007), así como proteínas del heterocisto maduro como las subunidades de la nitrogenasa. Esto sugiere que la fracción de proteínas correspondiente a los heterocistos aparecía suficientemente representada en la muestra.

### 3.3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ALGUNOS GENES SELECCIONADOS A PARTIR DEL ESTUDIO PROTEÓMICO

Se llevó a cabo un estudio de la expresión de los genes correspondientes a 46 de las 76 proteínas determinadas en el análisis proteómico (apartado anterior), mediante análisis de northern (apartado 2.3.4, Materiales y Métodos) (Tabla 3.6; Fig. 3.35). Para la selección de estas 46 ORFs se tuvo en cuenta la posible función de sus productos génicos (la información adicional se muestra en la Tabla 3.6), siendo de especial interés aquéllos que tuvieran función desconocida. En relación al proceso de diferenciación también se tuvieron en cuenta las proteínas relacionadas con la regulación a nivel de ácidos nucleicos (transcripción y traducción) y aquellas ORFs que determinaran (posibles) sistemas de transporte, ya que podrían estar implicados en la transferencia intercelular de metabolitos potencialmente interesantes en el desarrollo de los heterocistos o en el funcionamiento del heterocisto maduro. Como información complementaria se usó la resultante del análisis del transcriptoma de *Anabaena* realizado por Ehira y Ohmori (2006a), en el que se observaba que la expresión de alguno de los genes identificados en nuestro estudio aumentaba durante el proceso de diferenciación de los heterocistos (ver la introducción de este apartado de Resultados).

Como se muestra en la Figura 3.35, se encontraron diversos patrones de expresión para los genes correspondientes a las proteínas seleccionadas: (A) genes con expresión indetectable (o muy baja) en filamentos creciendo con amonio e inducibles en condiciones de deficiencia de nitrógeno (*all1301*, *all1692*, *all1872*, *all2004*, *all4252*, *all4877*); (B) genes cuyos transcritos se observaban en cultivos en presencia de amonio y cuyo nivel se incrementaba en condiciones de deficiencia de nitrógeno (*alr1238*, *all1239*, *alr1240*, *all1338*, *alr1700*, *alr1810*, *alr3832*, *all3953*, *all4092*, *all4294*, *all4623*, *alr7083*); y (C) genes cuya expresión disminuía al inicio de la diferenciación de los heterocistos

Tabla 3.6. ORFs seleccionadas para el análisis mediante northern.

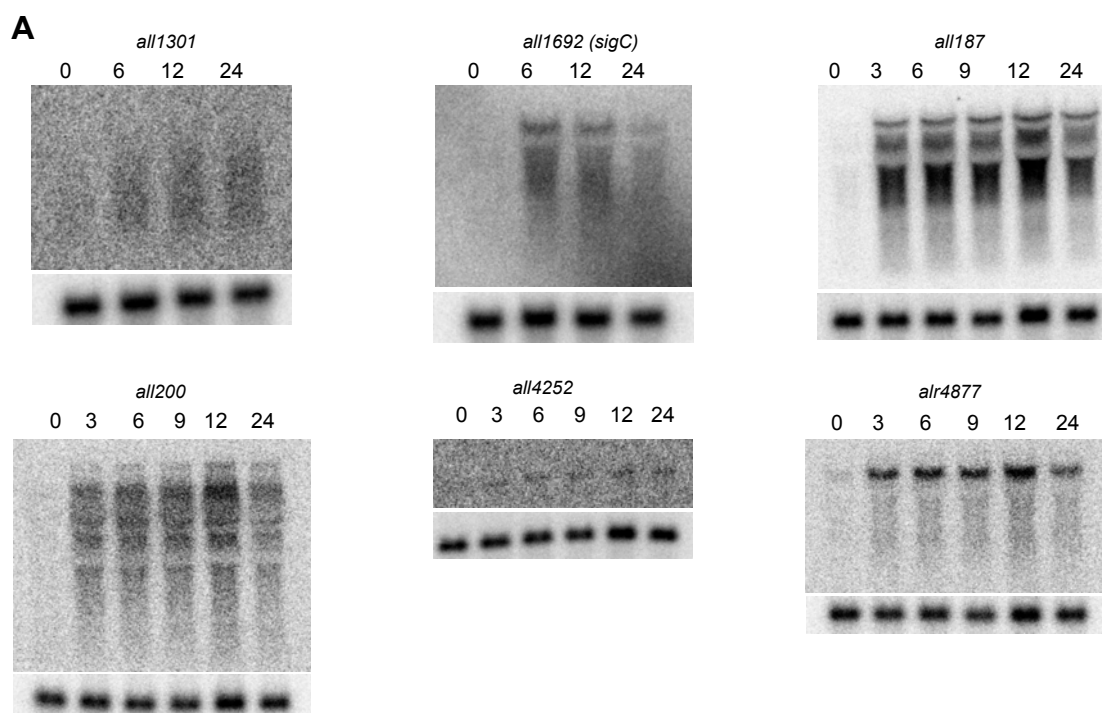
Muestra <sup>a</sup>	gen <sup>b</sup>	Identidad y/o función de la proteína <sup>c</sup>	Ehira y Ohmori, 2006 <sup>d</sup>		
			3 h	8 h	24 h
a15	<i>alr0237</i>	Leucina aminopeptidasa; posible función en degradación de proteínas	0,97	0,77	0,48
a4	<i>alr0585</i>	Posible glicosiltransferasa	0,61	0,71	0,46
a27	<i>all0844</i>	Peptidil-tRNA hidrolasa	1,1	0,76	1,16
d8	<i>alr1008</i>	Posible rRNA metiltransferasa	1,48	1,4	1,90
b2	<i>all1076</i>	PlmA (Lee <i>et al.</i> , 2003). Posible regulador transcripcional de la familia GntR que afecta al número de copias de plásmidos en <i>Anabaena</i> .	2,75	1,63	0,72
a7	<i>alr1207</i>	Quinasa de uridilato, glutamato o aspartato	0,99	0,92	0,69
b14	<i>alr1209</i>	Geranilgeranil reductasa posiblemente involucrada en la biosíntesis de clorofila	1,07	0,84	1,95
d4	<i>alr1238</i>	Proteasa Clp dependiente de ATP, subunidad proteolítica (Stanne <i>et al.</i> , 2007)	2,29	2,11	1,56
d2	<i>all1239</i>	Desconocida	1,25	1,32	0,98
b5	<i>alr1240</i>	Posible ribonucleasa R (exorribonucleasa II)	1,12	1,15	0,9
a5	<i>alr1301</i>	Proteína exclusiva de cianobacterias formadoras de heterocistos de función desconocida	-	-	-
d25	<i>all1338</i>	Desconocida; con un posible dominio de unión a DNA	1,44	1,51	1,1
a11	<i>alr1562</i>	Desconocida	1,87	1,41	-
c11	<i>all1692</i>	SigC, subunidad sigma RNA polimerasa (Brahamsha y Haselkorn, 1992)	4,7	8	1,81
a1, d9	<i>alr1700</i>	Desconocida	1,3	1,26	0,66
d19	<i>all1782</i>	Desconocida; tiene un dominio de tipo "von Willebrand", común en proteínas componentes de complejos multiproteicos	1,1	1,19	1,68
d20	<i>alr1810</i>	Desconocida; exclusiva de cianobacterias formadoras de heterocistos	-	-	-
b11, c9	<i>all1872</i>	Posible ATPasa de la familia AAA+	3,09	2,88	0,55
a17	<i>all1875</i>	Posible metalofosfoesterasa	1,3	1,23	0,79
a22	<i>alr1901</i>	Ciclasa de fosfato terminal 3' de RNA	-	1,25	1,86
a21	<i>all2004</i>	ATPasa de tipo P transportadora de cationes	10,33	6,4	3,5
a19	<i>alr2780</i>	DNA topoisomerasa I	1,47	1,31	0,72
a18	<i>alr3425</i>	Posible glicosiltransferasa	2,04	1,4	0,84
d17	<i>alr3593</i>	Polifosfato quinasa	1,07	1,27	1
d12	<i>all3678</i>	Desconocida; presenta un dominio de la familia de las metalo- $\beta$ -lactamasas	1,27	0,88	0,5
a8, b9	<i>alr3716</i>	Excinucleasa ABC, subunidad A (UvrA)	-	-	-
d24	<i>alr3832</i>	Factor de iniciación de la traducción IF-2	1,33	1,04	0,93
c10, d10	<i>alr3921</i>	UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa	1,21	1,52	0,98
c5, d6	<i>all3953</i>	Regulador transcripcional de la familia LysR	1,14	0,99	1,12
b13	<i>all3989</i>	Contiene dominios fosfoesterasa y polinucleótido-adenilil transferasa	1,55	1,91	1,69
d15	<i>all4092</i>	Desconocida; posible chaperona relacionada con procesos de exportación	1,70	0,59	1,87
a13	<i>all4144</i>	Desconocida; posible chaperona de la familia GrpE con un dominio de unión al DNA	1,07	1,27	1
b7	<i>alr4149</i>	Biliverdina reductasa (metabolismo de porfirina y clorofila)	1,80	1,59	1,19
a20	<i>all4248</i>	Proteína PriA de la replicación del DNA	1,01	1,00	2,26
a12, b12	<i>all4252</i>	Posible óxido-reductasa; tiene dos dominios óxido-reductasa	1,46	1,49	1,70
a25	<i>all4294</i>	Probable N-acetilmuramoi-L-alanina amidasa (proteína de unión al peptidoglicano)	1,81	1,68	2,69
a16, d13	<i>alr4331</i>	Ribonucleasa E	1,46	1,25	0,80
c1	<i>all4337</i>	Factor de elongación de la traducción EF-Tu	0,68	0,92	1,52
a26	<i>all4343</i>	Desconocida; probable proteína periplásmica	1,23	1,70	1,15
a2	<i>alr4404</i>	Peroxidasa de la familia AhpC/TSA	0,61	0,81	1,33
d11	<i>alr4571</i>	Flavoproteína de modificación de tRNA (uridina 5-carboximetilaminometilo)	1,04	0,93	0,99
a23	<i>all4623</i>	Factor de iniciación de la traducción IF-3	1,42	1,55	0,88
d21	<i>alr4851</i>	Subunidad del sistema Sec de translocación de proteínas (SecA)	1,07	0,64	0,65
b10	<i>alr4877</i>	Desconocida; posible proteína de la pared celular exclusiva de cianobacterias formadoras de heterocistos; en su segunda mitad, la proteína presenta dominios WD-40 de interacción entre proteínas	2,90	2,17	1,22
d23	<i>alr7083</i>	Proteína de la familia ParB de segregación de plásmidos o cromosomas (el gen <i>alr7083</i> está localizado en el plásmido $\alpha$ )	-	-	-
d1	<i>all7185</i>	Desconocida; posible proteína de la pared celular exclusiva de cianobacterias formadoras de heterocistos (el gen <i>all7185</i> está localizado en el plásmido $\alpha$ )	-	-	-

<sup>a</sup> Identificación de la muestra en el gel (Fig. 3.34). <sup>b</sup> Gen correspondiente a la proteína identificada mediante espectrometría de masas. <sup>c</sup> Posible identidad o función de la proteína en base a análisis informáticos. <sup>d</sup> Análisis del transcriptoma de *Anabaena* mediante "microarray" de filamentos cultivados con nitrato e incubados 3, 8 ó 24 h en deficiencia de nitrógeno combinado (Ehira y Ohmori, 2006a); los valores indican el incremento de la expresión génica respecto al cultivo creciendo en nitrato (valor =1).

## Resultados

y se recuperaba a las 12-24 h de incubación en ausencia de nitrógeno combinado (C1: *alr0237*, *all0844*, *alr1207*, *alr3716*, *all4337*, *alr4404*), superándose en algunos casos el nivel de expresión inicial en amonio (C2: *all3678*, *all4331*, *all4851*). La expresión de algunas otras ORFs seleccionadas no se pudo determinar mediante el análisis de northern (D1: *alr0585*, *alr1008*, *alr1562*, *alr3425*, *all3989*, *all4144*, *alr4149*, *all4343*) o el patrón de expresión era difícil de determinar en base a los resultados obtenidos (D2: *all1076*, *alr1209*, *all1782*, *alr1875*, *alr1901*, *alr2780*, *alr3593*, *alr3921*, *all4248*, *alr4571*, *all7185*).

Aunque los niveles de transcrito no se correspondan necesariamente con niveles de proteína, estos resultados confirman que los genes de 21 de las proteínas identificadas en el análisis proteómico incrementan su expresión en deficiencia de nitrógeno (los recogidos en A, B y C2). En contraste, para 6 proteínas no se observa un incremento en la transcripción de sus genes (C1). Finalmente, para 19 proteínas el análisis mediante northern de la expresión de sus genes no dio ninguna información adicional (D).



**Figura 3.35. Estudio de la expresión de los genes de *Anabaena* sp. PCC 7120 determinados en el estudio proteómico.** Se llevó a cabo el análisis mediante northern de la expresión de los genes indicados con RNA aislado de filamentos creciendo con amonio (0 h), o de filamentos cultivados con amonio e incubados en deficiencia de nitrógeno combinado durante las horas que se indican en cada caso. Los genes estudiados se agrupan según el patrón de expresión: (A) genes inducibles sin expresión detectable (o expresión muy baja) en cultivos creciendo con amonio; (B) genes cuya expresión aumenta durante el proceso de diferenciación; (C1 y C2) genes que presentan una disminución en la cantidad de transcrito durante el proceso de diferenciación, recuperándose a las 12-24 h de inducción; y genes cuyo patrón de expresión era indetectable mediante análisis de northern (D1) o difícil de interpretar (D2). La cantidad de RNA varía de un filtro a otro (20, 25 ó 37 µg). Las sondas utilizadas en cada experimento se obtuvieron por PCR utilizando como molde el DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 y la pareja de oligonucleótidos correspondiente como cebadores (Tabla 2.7b, denominados según el nombre de la ORF). Como control de carga y transferencia se hibridó con el gen *rnpB* de *Anabaena* (panel inferior de cada experimento de northern).

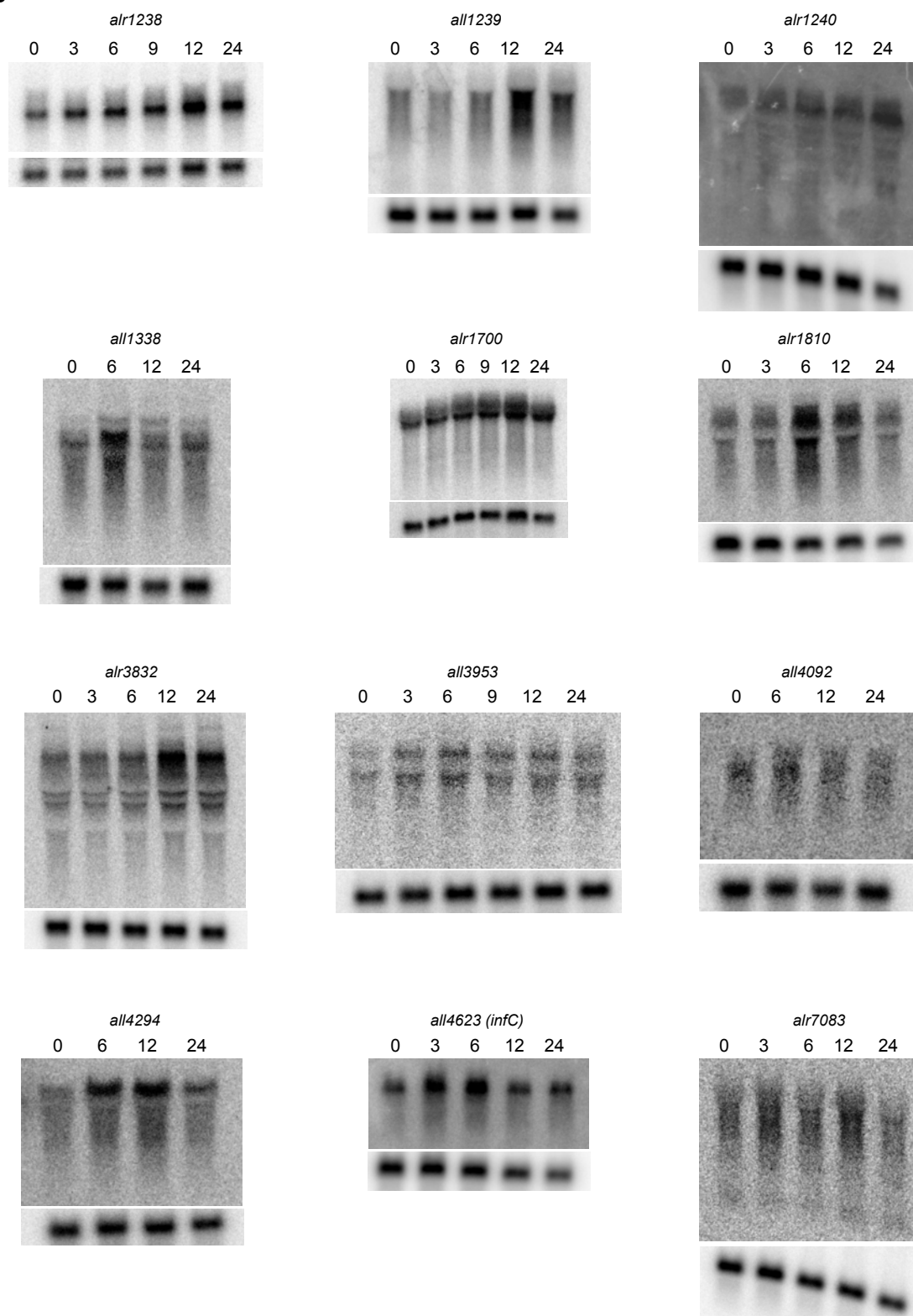
**B**

Figura 3.35. Estudio de la expresión de los genes de *Anabaena* sp. PCC 7120 determinados en el estudio proteómico.(Continuación).

## Resultados

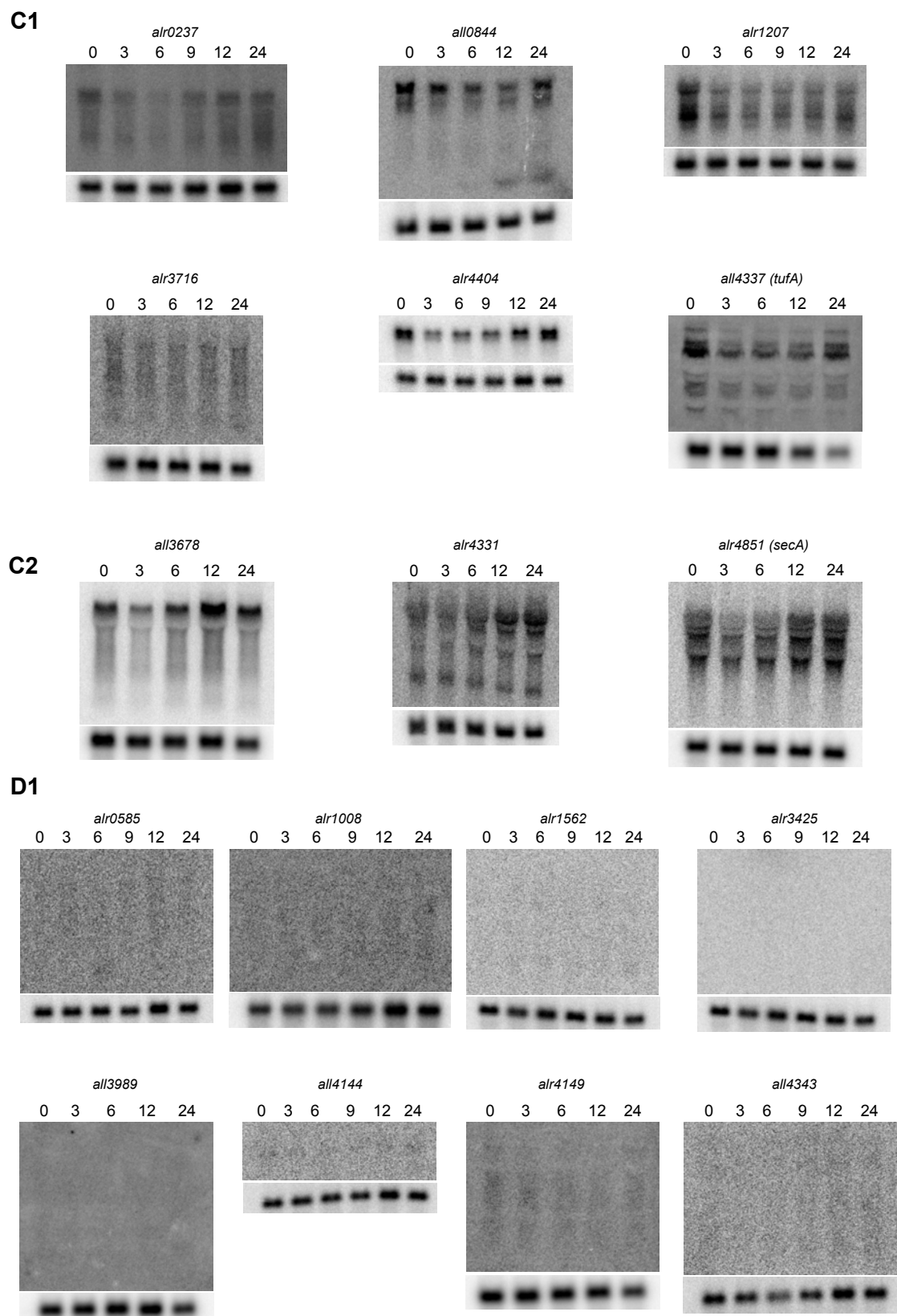


Figura 3.35. Estudio de la expresión de los genes de *Anabaena* sp. PCC 7120 determinados en el estudio proteómico.(Continuación).



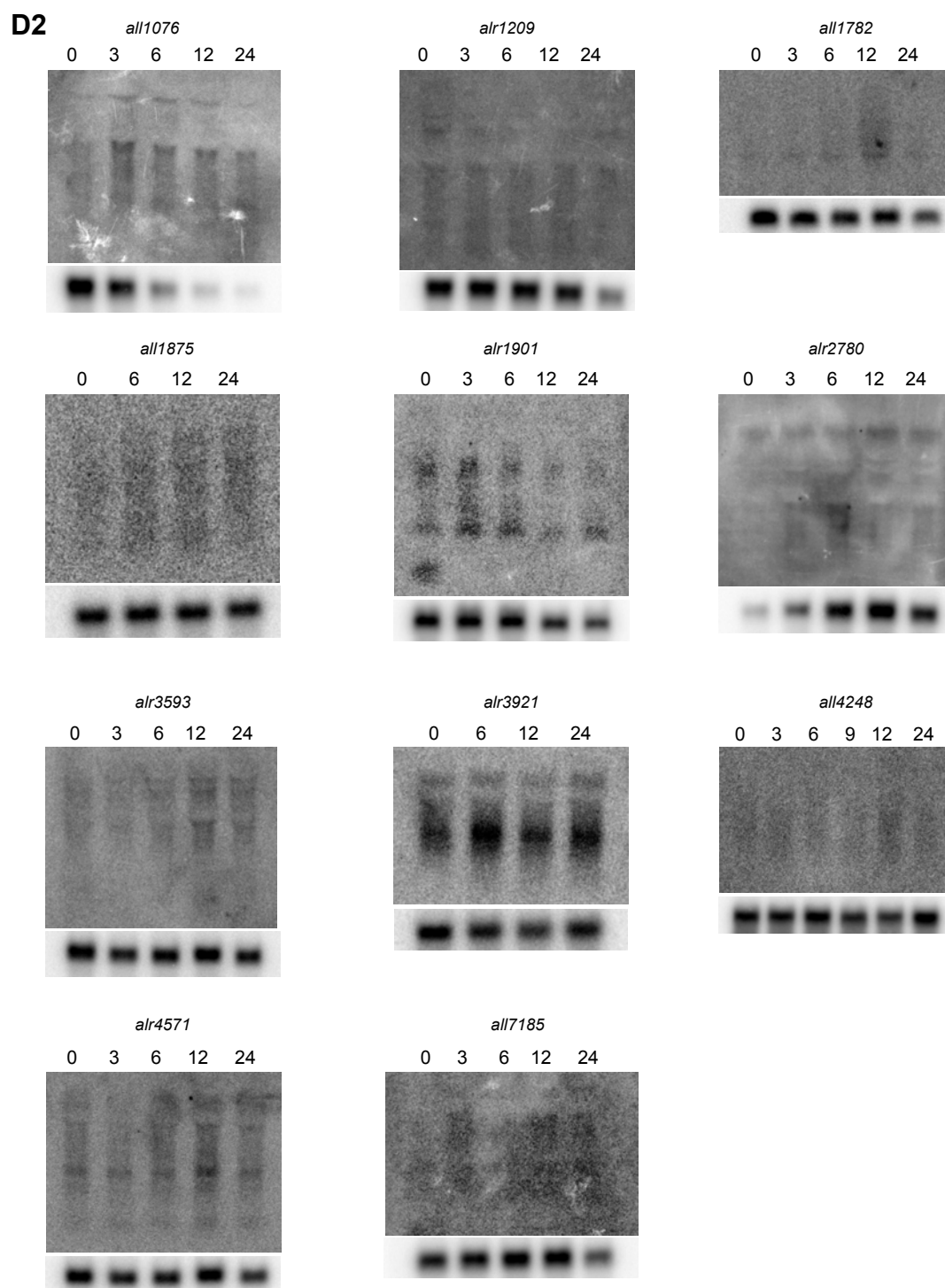


Figura 3.35. Estudio de la expresión de los genes de *Anabaena* sp. PCC 7120 determinados en el estudio proteómico. (Continuación).



## 4. DISCUSIÓN



## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. REGULACIÓN POR NtcA DEL DESARROLLO DE LOS HETEROCISTOS

Los heterocistos son células especializadas en la fijación del nitrógeno atmosférico que se encuentran en algunas cianobacterias filamentosas y se diferencian a partir de células vegetativas en respuesta a una situación de estrés de nitrógeno. Entre otros factores, el inicio del proceso de desarrollo requiere las proteínas NtcA (Frías *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994), el regulador global de la asimilación del nitrógeno en cianobacterias (Herrero *et al.*, 2004), y HetR, un factor de regulación positiva del desarrollo (Buikema y Haselkorn, 1991b; Black *et al.*, 1993). La expresión de los genes correspondientes, *ntcA* y *hetR*, está sujeta a regulación por nitrógeno aumentando transitoriamente en condiciones de ausencia de nitrógeno combinado.

En *Anabaena* sp. PCC 7120, NtcA se requiere no sólo al inicio del desarrollo sino también para la activación de la expresión de genes cuyos productos son necesarios durante la progresión del proceso de diferenciación y en el heterocisto maduro (Herrero *et al.*, 2004). El mecanismo molecular mediante el cual NtcA activa de forma selectiva unos promotores y no otros en las distintas etapas del desarrollo se desconoce. Se han propuesto como posibles elementos implicados en el establecimiento de la jerarquía de activación génica: la concentración celular de proteína NtcA durante el proceso de diferenciación (Ramasubramanian *et al.*, 1996; Muro-Pastor *et al.*, 2002), la estructura de los promotores regulados por NtcA (Herrero *et al.*, 2004) y la activación metabólica de NtcA según las condiciones C/N celulares (Luque *et al.*, 2004), sin descartar el posible requerimiento de otros factores reguladores que podrían actuar de forma conjunta con NtcA.

El incremento de la cantidad de transcrito *ntcA* durante el proceso de diferenciación podría tener lugar de forma localizada en las células que se están diferenciando, del mismo modo que sucede con otros genes específicos del desarrollo como *hetR* (Black *et al.*, 1993) o *patS* (Yoon y Golden, 1998; 2001). El análisis realizado en este trabajo de la actividad de la región promotora de *ntcA* utilizando la proteína testigo GFP ha mostrado, de hecho, que el paso de filamentos de *Anabaena* sp. PCC 7120 creciendo con amonio a medio sin nitrógeno combinado conduce al incremento de la expresión de *ntcA* en todo el filamento, pero de forma más significativa en los proheterocistos (estirpe CSEL4a, Fig. 3.14). Este incremento se mantiene en los heterocistos maduros, pero parece que sólo hasta una cierta edad de los mismos, ya que en cultivos establecidos de filamentos creciendo diazotróficamente algunos heterocistos presentan un nivel de fluorescencia GFP similar al de las células vegetativas adyacentes (estirpe CSEL4a, Fig. 3.15). Este resultado apoya la probable implicación del nivel intracelular de NtcA en la activación selectiva de la expresión de genes específicos del desarrollo.

Como se ha comentado en la Introducción, la inducción de la expresión de *hetR* en el contexto del desarrollo precede a la de *ntcA*, y ambos genes presentan una dependencia mutua, es decir, el incremento de la expresión de *hetR* no tiene lugar en un mutante *ntcA* y no se observa inducción transitoria de *ntcA* en un fondo *hetR* (Muro-Pastor *et al.*, 2002). La regulación de la expresión de algunos genes específicos del desarrollo depende de NtcA y de HetR. Dado que HetR se requiere para inducir el incremento transitorio de NtcA, nos planteamos la posibilidad de que la doble dependencia por HetR y NtcA que exhiben estos genes pudiera ejercerse a nivel transcripcional vía NtcA. Para estudiar esta hipótesis, construimos unas estirpes derivadas de *Anabaena* sp. PCC 7120 que presentan elevados niveles de la proteína NtcA de forma independiente de HetR y de las condiciones nitrogenadas del medio, en fondo silvestre (estirpe CSEL1) y en un fondo mutante *hetR* (estirpe CSEL2).

La expresión constitutiva de *ntcA* desde un promotor heterólogo en todas las células del filamento (estirpe CSEL1) no promueve el desarrollo de heterocistos en presencia de nitrógeno combinado (apartado 3.1.3, Resultados), a diferencia de lo que sucede con otros reguladores positivos del desarrollo como HetR (Buikema y Haselkorn, 2001) o con la inactivación de factores negativos del mismo como PatS (Yoon y Golden, 1998). Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Wei *et al.* (1994) cuando introducían en *Anabaena* sp. PCC 7120 copias extra de *ntcA* bajo la dirección de su promotor (251 pb de región promotora) en un plásmido anfibio, y por Wong y Meeks (2002) al complementar el mutante *ntcA* de *Nostoc punctiforme*. En ambos casos una mayor dosis de *ntcA* no se traducía en el desarrollo de heterocistos en presencia de nitrógeno combinado. Estos resultados sugieren que la activación transcripcional mediada por NtcA durante el proceso de diferenciación no sólo requiere un incremento en la cantidad de proteína, sino también la percepción del estado nitrogenado de la célula. De la misma forma, el nivel incrementado de proteína tampoco es suficiente para activar la expresión del operón *nir*, de asimilación de nitrato, en condiciones represoras (en presencia de amonio) (Fig. 3.10). Esta observación es consistente con los resultados obtenidos con una estirpe derivada de *Synechococcus* sp. PCC 7942 que sobreexpresa *ntcA* desde el promotor *trc*, en la que existe represión por amonio independientemente del nivel de NtcA intracelular (Luque *et al.*, 2004). Sin embargo, en el caso del operón *nir* de *Anabaena*, el requerimiento de otros factores implicados en la regulación de la expresión del mismo (Frías *et al.*, 2000; 2003) podría influir en la falta de expresión observada en la estirpe CSEL1 en presencia de amonio.

El hecho de que siga existiendo un requerimiento metabólico para la activación de la transcripción de los genes regulados, a pesar de la expresión constitutiva de NtcA, indica que además de la regulación a nivel de expresión de *ntcA*, la actividad de la proteína como activador transcripcional también está regulada. En *Synechococcus* sp. PCC 7942, se ha visto que el uso de los promotores regulados por NtcA de los genes *glnB*, que determina la proteína señalizadora P<sub>II</sub>

(Lee *et al.*, 1999), y *amt1*, que determina un transportador de amonio de alta afinidad (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002c) así como del operón *nir* (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2003), depende de la fuente de N y también de la fuente de C, de forma que NtcA se activa cuando hay limitación de amonio pero dependiendo de la disponibilidad de carbono, integrando la asimilación de nitrógeno con la asimilación fotosintética del CO<sub>2</sub>. Este efecto positivo ejercido por el suplemento de C sobre la expresión de genes regulados por N es reproducido por el 2-OG en una estirpe portadora de una permeasa heteróloga de 2-OG (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2000; 2003). Estos resultados, que apuntan al 2-OG como molécula señalizadora del balance C/N en el contexto de la activación de NtcA, concuerdan con los observados *in vitro* en los que el 2-OG estimula la unión de NtcA al DNA (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002b) y se requiere para la transcripción de algunos promotores dependientes de NtcA en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Tanigawa *et al.*, 2002) o *Anabaena* sp. PCC 7120 (Valladares *et al.*, sin publicar). En *Anabaena* sp. PCC 7120, se ha visto que el nivel de 2-OG aumenta de forma transitoria en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado (Laurent *et al.*, 2005) y que éste ejerce un efecto positivo en el desarrollo de los heterocistos en una estirpe que tiene clonado la permeasa heteróloga de 2-OG (Li *et al.*, 2003). Por otra parte, en *Synechococcus* sp. PCC 7942 se ha observado que la activación de la expresión de genes dependientes de NtcA en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado requiere la proteína de transducción de señales P<sub>II</sub> (Aldehni *et al.*, 2003; Paz-Yepes *et al.*, 2003; Sauer *et al.*, 2000), la cual responde al balance C/N y al estado energético de la célula (revisado en Forchhammer, 2004). Se ha propuesto que P<sub>II</sub> es necesaria para la aclimatación de las células cultivadas en presencia de amonio a la condición de deficiencia de nitrógeno facilitando o potenciando la respuesta de NtcA a dicha deficiencia (Paz-Yepes *et al.*, 2003). En *Anabaena* sp. PCC 7120 también se ha sugerido su actuación en la adaptación de la célula a la deficiencia de nitrógeno, aunque no es necesaria para el inicio del desarrollo de los heterocistos (Laurent *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007).

En el contexto del desarrollo, el análisis de la expresión de genes específicos del proceso de diferenciación dependientes de NtcA y HetR mostró que la sobreexpresión de NtcA en un fondo *hetR*, estirpe CSEL2, no promueve la expresión de los operones *nifHDK* o *cox2* en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado (Fig. 3.7). Por el contrario, la expresión de *devBCA* se induce por la presencia de elevados niveles de NtcA en ausencia de una proteína HetR funcional (Fig. 3.7), incluso en presencia de amonio, lo que tendría lugar en todas las células del filamento, al menos en la estirpe CSEL2 que no desarrolla heterocistos. Estos resultados indican que los promotores de algunos genes del desarrollo de los heterocistos pueden ser activados directamente por NtcA y su dependencia por HetR se puede eliminar incrementando los niveles de la proteína NtcA. Pero HetR es necesario para la expresión de otros promotores, ya que es esencial para la expresión de genes específicos del heterocisto como son los de los operones *nifHDK* y *cox2*. Hay que señalar que de los tres genes analizados sólo se ha descrito un promotor regulado por NtcA de Clase II para *devBCA*

(Tabla 1.2), que podría activarse tempranamente en todo el filamento tras detectarse la deficiencia de nitrógeno combinado.

Como indicación de la progresión del proceso de diferenciación también se estudió la reordenación de las regiones genómicas de *nifD* y de *fdxN* (Figuras 3.8 y 3.9; apartado 1.2.1, Introducción) que conduce a la escisión de fragmentos de 11 y 55 kb, respectivamente. Estos procesos se consideraban eventos tardíos del desarrollo (Haselkorn *et al.*, 1986), pero en nuestras condiciones de laboratorio observamos la escisión de ambos elementos a las 9 h de inducción, es decir, las reordenaciones tienen lugar antes de la formación de un heterocisto maduro. Determinamos que ambos procesos son dependientes de HetR, ya que en la estirpe 216 no tiene lugar la escisión del fragmento de 11 kb y la del elemento de 55 kb sólo se detecta levemente a las 24 h de inducción, y confirmamos el requerimiento por NtcA en ambos casos (Figuras 3.8 y 3.9; Wei *et al.*, 1994). La sobreexpresión de NtcA en fondo silvestre no promueve la escisión del elemento de *nifD*; sin embargo, en fondo mutante *hetR* ésta tiene lugar incluso en presencia de nitrógeno combinado (Fig. 3.8). La reordenación de la región *nifHDK* no requiere factores específicos del desarrollo, excepto XisA (que determina la recombinasa que cataliza el proceso de escisión), ya que la expresión de *xisA* desde un promotor constitutivo heterólogo promueve la escisión en células vegetativas (Brusca *et al.*, 1990). Nuestros resultados sugieren que HetR ejerce un papel negativo y podría evitar la escisión en células vegetativas. Una posibilidad sería que NtcA y/o HetR ejercieran su acción a través de la regulación de *xisA*, el cual se ha sugerido que podría estar regulado por NtcA, ya que se ha observado la unión *in vitro* de NtcA a tres sitios de su región promotora (Chastain *et al.*, 1990). En el caso del elemento de *fdxN*, el nivel incrementado de NtcA promueve la reordenación en el fondo silvestre (estirpe CSEL1), pero no en el fondo mutante *hetR*. Se han descrito tres factores que intervienen en el proceso de reordenación del elemento de 55 kb, la recombinasa específica de sitio XisF y otros dos, XisH y XisI, posiblemente implicados en la especificidad celular de la escisión (Carrasco *et al.*, 1994; Ramaswamy *et al.*, 1997), pero se desconoce la dependencia por NtcA o HetR de su expresión.

Las estirpes CSEL1 [*ntcA*(Con)] y CSEL2 [*hetR*, *ntcA*(Con)] presentan un crecimiento similar al de PCC 7120 en presencia de amonio o nitrato. Sin embargo, en ausencia de nitrógeno combinado, la estirpe CSEL1, aunque desarrolla heterocistos funcionales que presentan actividad nitrogenasa, no es capaz de mantener el crecimiento diazotrófico (Fig. 3.5), ya que parece que sólo desarrolla una generación de heterocistos. Cuando se reinoculan en medio fresco con amonio o nitrato filamentos procedentes de medio sin nitrógeno combinado, el crecimiento se recupera, lo que indica que la sobreexpresión de NtcA no es letal para las células. Una posible explicación para el efecto deletéreo de los elevados niveles de NtcA en ausencia de nitrógeno combinado podría estar relacionada con el papel represor de NtcA (revisado en Herrero *et al.*, 2001). El operón *rbcLXS*, que determina el complejo enzimático Rubisco, no se expresa en los heterocistos de *Anabaena* sp. PCC



7120 (Elhai y Wolk., 1990), y se ha demostrado *in vitro* que NtcA interacciona con la región promotora de dicho operón en una posición compatible con un papel represor (zona -12 a +12 respecto al TSP) (Ramasubramanian *et al.*, 1994), por lo que se ha sugerido que la falta de expresión de *rbcLXS* en los heterocistos pueda deberse a la represión ejercida por NtcA. El análisis de la expresión del operón *rbcLXS* en la estirpe CSEL1 muestra que la sobreexpresión de NtcA determina un apreciable grado de represión incluso en presencia de amonio (Fig. 3.10B). Esto sugiere que el papel represor de NtcA podría ejercerse sin necesidad de modificaciones de la proteína o de la acción de efectores, simplemente dependiendo de los niveles de NtcA, como se ha sugerido también en la regulación del gen *gltX* en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Luque *et al.*, 2002).

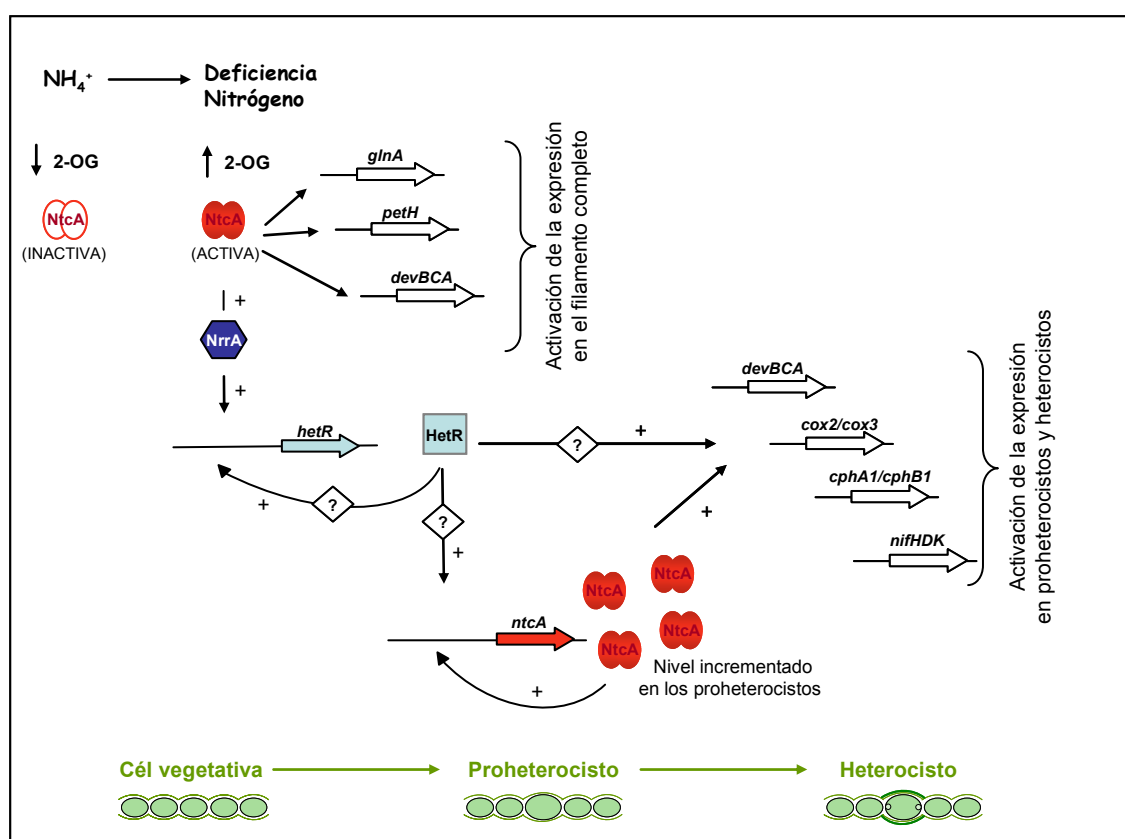


Figura 4.1. Modelo de activación de la expresión de genes específicos del desarrollo de los heterocistos dependientes de NtcA y HetR. Ver texto.

Los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con el modelo de activación de la transcripción mediada por NtcA y HetR durante el proceso de diferenciación propuesto por Herrero *et al.* (2004), que se presenta de forma adaptada en la Figura 4.1. Tras eliminarse el nitrógeno combinado del medio de cultivo, la proteína NtcA presente en niveles relativamente bajos en las

células se activaría en respuesta al cambio producido en el balance celular C/N. La proteína NtcA activa induciría, en todas las células del filamento, la expresión desde promotores regulados por nitrógeno e independientes de HetR que se activan temprano en el proceso de diferenciación como los de los genes *nrrA*, *glnA* y *petH* y, posiblemente, *devBCA*. También promovería la inducción del gen *hetR*, probablemente vía NrrA, en las células destinadas a diferenciarse. La proteína HetR, presente en un nivel elevado en las células en desarrollo, regularía la expresión de genes dependientes de la misma de forma localizada en las células que se están diferenciando, como *ntcA* y *devBCA*. El incremento del nivel de proteína NtcA en los proheterocistos, además de la posible acción de HetR y de otros factores reguladores, activaría la expresión de genes regulados por nitrógeno que se expresan en una fase tardía del desarrollo y en el heterocisto maduro (como son, por ejemplo, *cox2* y *nifHDK*).

### 4.2. LOS PROMOTORES DE *ntcA* EN *Anabaena* sp. PCC 7120

Los factores de transcripción que llevan a cabo la regulación de la expresión génica en respuesta a señales ambientales deben a su vez estar regulados, o bien a nivel de actividad o bien a nivel de expresión. El control de la actividad reguladora puede realizarse por diversos mecanismos, como los que se exponen a continuación (revisado en Browning y Busby, 2004): la afinidad del factor de transcripción por las secuencias de DNA diana es modulada por pequeños ligandos cuya concentración varía en respuesta a la disponibilidad de nutrientes o a situaciones de estrés, algunos reguladores se ven afectados por modificaciones covalentes y, en otros casos, la concentración en la célula determina la actividad.

Como se ha visto en el apartado anterior, se han descrito varios de estos mecanismos para la proteína NtcA. Por una parte, la afinidad por su secuencia diana *in vitro* aumenta en presencia de 2-OG, aunque aún no se conoce el modo en el que el 2-OG actúa sobre NtcA. Por otro lado, también el nivel de transcrito *ntcA* varía según la disponibilidad de nitrógeno (Luque *et al.*, 1994; Muro-Pastor *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 1994). En este trabajo se ha demostrado que la inducción de la expresión de *ntcA* en condiciones de deficiencia de nitrógeno en *Anabaena* sp. PCC 7120 se traduce en un aumento del nivel de la expresión mayoritariamente de forma localizada en los proheterocistos. De esta forma, la variación en la concentración intracelular de NtcA en el filamento es un mecanismo de regulación en respuesta a la falta de nitrógeno, y supondría una estrategia para la regulación diferencial de genes específicos del desarrollo de los heterocistos o del heterocisto maduro.

Con objeto de profundizar en el conocimiento de la regulación de la transcripción de *ntcA* durante el proceso de diferenciación de los heterocistos, se ha realizado un estudio detallado de su región promotora. Los datos de expresión de la proteína testigo GFP a partir de distintas versiones del promotor de *ntcA*, ensayos de extensión de cebador, análisis de northern, experimentos de retardo en gel provocado por NtcA y experimentos de protección frente a la digestión por DNasa I (ver el resumen de resultados en la página plastificada proporcionada) nos permiten profundizar en el mecanismo responsable de la expresión de *ntcA*. Para la interpretación de los resultados hay que tener en cuenta que las estirpes analizadas contienen un gen *ntcA* funcional con expresión silvestre. Por otra parte, también hay que considerar que la fluorescencia de las fusiones GFP proporciona información en relación a la localización en el filamento de la expresión génica durante el proceso de diferenciación, mientras que los datos obtenidos de los ensayos de extensión de un cebador y análisis de northern corresponden a transcritos aislados de filamentos completos resultado de la transcripción tanto en células vegetativas como en células en proceso de diferenciación. El estudio de la actividad del  $P_{ntcA}$  mediante el análisis del transcrito *gfp* (ensayos de extensión del cebador GFP4 y de northern) en la estirpe control CSEL6 ha proporcionado resultados similares a los obtenidos mediante el análisis del transcrito *ntcA* en la estirpe silvestre, lo que valida los resultados obtenidos con el sistema de estudio utilizado.

Como ya se ha descrito en la Introducción, en *Anabaena* sp. PCC 7120 *ntcA* presenta tres promotores con un perfil de expresión diferente dependiendo de las condiciones nitrogenadas del medio (Figuras 3.19 y 3.29, estirpe CSEL6) (Muro-Pastor *et al.*, 2002; Ramasubramanian *et al.*, 1996). El  $P_2$  es constitutivo y su uso es independiente de la regulación por nitrógeno. En la secuencia que precede al TSP -136 ( $P_2$ ) se identifica el hexámero TATCAT centrado en la posición -10 respecto al sitio de inicio de la transcripción que podría corresponder a la caja -10 (consenso: TAN<sub>3</sub>[TAA]T) del promotor, y 18 pb por delante de la misma se encuentra la secuencia TAGCTA que podría constituir la caja -35 (consenso: TTGN<sub>3</sub>[ACA]) (Fig. 4.3). De hecho, el cambio de secuencia de la posible caja -10 (TATCAT → ATTCAT), elimina la actividad promotora que genera el transcrito -136 (estirpe CSEL11, Fig. 3.29). Este promotor, con estructura de promotor tipo  $\sigma^{70}$  de *E. coli* podría ser reconocido por la RNA polimerasa con el factor sigma vegetativo (SigA) (Schneider *et al.*, 1991; Curtis y Martin, 1994). El  $P_1$  presenta un nivel de expresión basal que, al igual que el de  $P_2$ , es independiente de la regulación por nitrógeno y se expresa en fondo mutante *ntcA*. En ausencia de nitrógeno combinado, la actividad de  $P_1$  aumenta de forma transitoria observándose la máxima expresión a partir de las 6 h de inducción, y su activación es dependiente de NtcA y HetR. Los elementos reguladores de  $P_1$  necesarios para desarrollar la actividad basal se localizan en el fragmento de 43 pb anterior al TSP -49 (estirpe CSEL9, Fig. 3.19), lo que coincide con el resultado obtenido por Wei *et al.* (1994) en el que la expresión de *ntcA* desde el fragmento de 87 pb previo al inicio del gen (con 38 pb por delante del TSP -49) era suficiente para permitir el crecimiento en

medio con nitrato. En dicho fragmento se identifica una posible caja -10 (TATTCT) centrada en -8,5 respecto al TSP, aunque la secuencia localizada 17 pb ( $\pm 1$ ) por delante de la misma no se asemeja a una caja -35 de promotores tipo  $\sigma^{70}$  de *E. coli* (Fig. 4.3). Se han descrito dos posibles sitios de unión de NtcA, centrados en las posiciones -103,5 (proximal) y -143,5 (distal) respecto al codón de inicio de la traducción del gen, que podrían mediar la regulación por NtcA del mismo (Laurent *et al.*, 2005; Ramasubramanian *et al.*, 1996). El promotor que genera el TSP -180 ( $P_3$ ) sólo se activa en ausencia de nitrógeno combinado durante el proceso de diferenciación y es dependiente de NtcA y HetR. No se ha descrito ningún sitio de unión de NtcA en la región anterior al TSP -180 y se desconoce el mecanismo de regulación mediado por HetR. Precediendo al inicio de la transcripción -180 hay una secuencia que podría ser una posible caja -10 (TATCTA, centrada en -7 respecto al TSP), aunque esta región del promotor está poco conservada (Fig 4.3). El análisis comparativo de las secuencias previas a sitios de inicio de la transcripción determinados experimentalmente, realizado por Curtis y Martin (1994) sugirió que los promotores basales cianobacterianos comparten con los promotores  $\sigma^{70}$  de *E. coli* el elemento -10, pero la caja -35 está poco conservada o ausente.

La observación de que la estirpe CSEL4a presenta crecimiento silvestre en todas las condiciones ensayadas indica que el fragmento de 603 pb que precede al gen *ntcA* en dicha estirpe contiene todos los elementos necesarios para su regulación. Este resultado es consistente con la observación de que en la estirpe CSEL6 (en la que la expresión de *gfp* está bajo la dirección de dicho fragmento) la expresión de *gfp* y localización de fluorescencia GFP en los proheterocistos es idéntica a la observada en la estirpe CSEL4a. Sin embargo, cuando se elimina el fragmento anterior a la posición -182 (estirpe CSEL7, Fig. 3.21), esta localización desaparece, lo que muestra la importancia de  $P_3$  en la expresión localizada de *ntcA*. Esto es consistente con los resultados obtenidos por Wei *et al.* (1994) y Ramasubramanian *et al.* (1996) en los que se determinó la elevada actividad promotora del fragmento -171 a -251 (respecto al gen) en condiciones de deficiencia de nitrógeno, y el requerimiento del fragmento por delante de la posición -87 (hasta -251) para el crecimiento diazotrófico de *Anabaena*. En CSEL7 los promotores que generan los TSPs -136 y -49 están activos, pero no se observa el aumento transitorio del transcrito -49, lo que sugiere que la expresión desde  $P_3$  o la región anterior a -182 interviene en la regulación de la actividad de  $P_1$  en condiciones de deficiencia de nitrógeno. Esto podría estar relacionado con una activación coordinada de ambos promotores durante el desarrollo de los heterocistos. El aumento de fluorescencia GFP en todo el filamento que se observa en CSEL7 se debe a la transcripción desde el promotor  $P_2$  y el componente basal de  $P_1$  (Fig. 3.19; Fig. 3.20; Fig. 3.21).

El funcionamiento de  $P_3$  es exclusivo del desarrollo y depende de NtcA y de HetR, pero se desconoce su mecanismo de activación. HetR podría regular su expresión por acción directa sobre el promotor, o la regulación de  $P_3$  podría depender de algún elemento positivo que se activara en condiciones de deficiencia de nitrógeno, de forma dependiente de NtcA y HetR, en las células

destinadas a diferenciarse. Otra posibilidad sería que el inicio de la transcripción requiriese un factor sigma específico del desarrollo. Aunque no se ha determinado la implicación directa de ningún factor sigma en el proceso de diferenciación, probablemente debido a la existencia de redundancia funcional entre distintos factores sigma (Khudyakov y Golden, 2001), recientemente se ha demostrado que *sigC*, *sigE* y *sigG* se expresan transitoriamente en las células que se están diferenciando (Aldea *et al.*, 2007). Se ha propuesto, según su patrón temporal de expresión, que cada uno de estos factores sigma pudiera intervenir en la transcripción de genes del desarrollo en una etapa concreta del proceso, sin descartar la probable superposición de especificidad promotora de varios factores, proponiéndose SigC como el factor sigma que podría estar implicado en la etapa temprana del desarrollo. Esta propuesta sería consistente con la detección de SigC durante el proceso de diferenciación de los heterocistos en el análisis del subproteoma correspondiente a la fracción de proteínas que tienen afinidad por la heparina de filamentos de *Anabaena* sp. PCC 7120 sometidos a deficiencia de nitrógeno (Tabla 3.6; Fig. 3.35).

La eliminación de la secuencia anterior a la posición -143 resulta en la expresión elevada de *gfp* en todo el filamento en células creciendo con amonio (estirpe CSEL8, Fig. 3.21). La diferencia existente entre el fenotipo de CSEL7 y CSEL8 indica que la región comprendida entre las posiciones -182 y -143 respecto al inicio del gen tiene un efecto negativo en la expresión de  $P_1$ , único promotor utilizado en CSEL8, que podría estar mediado por la unión de un represor. En particular, la secuencia de 15 pb comprendida entre -158 y -143 parece ejercer un efecto negativo sobre la expresión, como se deduce de la comparación de las estirpes CSEL8 y CSEL14. Además, hay que señalar que en la estirpe CSEL8 tiene lugar el incremento localizado de fluorescencia GFP en los proheterocistos, de lo que se infiere que el elemento regulador del “componente inducible” de  $P_1$  permanece en el fragmento de 143 pb del promotor anterior al gen *ntcA*, concretamente en la región -143 a -92, ya que al eliminar esta secuencia no tiene lugar el aumento localizado de GFP ni la inducción transitoria del transcrito -49 (estirpe CSEL9; Fig. 3.21; Fig. 3.19).

La inducción de la expresión de  $P_1$  durante el proceso de diferenciación depende de NtcA y de HetR. NtcA podría mediar la regulación de  $P_1$  por interacción con la región promotora en los dos posibles sitios de unión descritos, localizados en -54,5 (sitio proximal) y -94,5 (sitio distal) respecto del TSP -49. Los análisis de protección frente a degradación por DNasa I han confirmado la unión de NtcA al sitio distal descrito por Ramasubramanian *et al.* (1996) y nos han permitido determinar que la segunda banda retardada que aparece en los ensayos de retardo en gel corresponde a la ocupación del sitio proximal (Figuras 3.23, 3.26 y 3.27). Por otra parte, en el ensayo de retardo realizado con el fragmento silvestre del  $P_{ntcA}$ , en presencia de alta concentración de proteína NtcA, aparece una tercera banda retardada más débil que las anteriores (Fig. 3.23A) que podría corresponder a la unión de NtcA en una zona en torno al TSP -180 como se observa en los experimentos de protección frente a degradación por DNasa I (Fig. 3.26). En esta región se

encuentra la secuencia GTAN<sub>8</sub>TAT, que podría corresponder a un posible sitio de unión de NtcA imperfecto o a una secuencia reconocible por NtcA al menos en ensayos realizados *in vitro*. NtcA presenta mayor afinidad por el sitio distal que por el proximal (Fig. 3.23), lo que sugiere que, en ausencia de otros factores competidores (por ejemplo, la RNA polimerasa) o de efectores metabólicos (como el 2-OG), y en condiciones celulares que determinan bajos niveles de NtcA, el sitio distal podría ser ocupado primero. Hay que señalar que este sitio, aunque no es canónico como el proximal (el segundo hemisito es AAC en vez de TAC), tiene las bases C y A en las posiciones segunda y tercera, respectivamente, detrás del triplete GTA, así como la base A en la primera y segunda posición detrás del triplete AAC, lo que contribuiría a proporcionar la elevada afinidad que NtcA presenta por el mismo (Herrero *et al.*, 2001; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002a). El 2-OG estimula la unión de la proteína NtcA a ambos sitios, siendo mayor el efecto observado sobre la unión al proximal (Fig. 3.25). La presencia de varios sitios de unión de NtcA con diferente afinidad por el regulador podría estar encaminada al desarrollo de una respuesta reguladora gradual (Gralla y Collado-Vides, 1996) a la condición de deficiencia de nitrógeno que determina elevados niveles celulares de 2-OG (Muro-Pastor *et al.*, 2001; Laurent *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos del análisis de fluorescencia GFP de las estirpes derivadas de *Anabaena* que portan versiones del P<sub>ntcA</sub> con mutaciones en los sitios de unión de NtcA (Fig. 3.30) muestran que la alteración de secuencia en uno de los dos sitios (estirpes CSE10 y CSEL11) no elimina el aumento localizado de expresión. Aunque las mutaciones introducidas (cambio del primer hemisito GTA por TAC) no eliminan completamente la unión de la proteína *in vitro* (Figuras 3.23, 3.26 y 3.27), sí parece que afectan al funcionamiento de los promotores *in vivo*. Los ensayos de extensión de un cebador muestran que la mutación del sitio proximal elimina la inducción del TSP -49 (estirpe CSEL10, Fig. 3.29), lo que indica que la inducción de P<sub>3</sub> es suficiente para la expresión localizada de GFP. Este resultado confirma el requerimiento del sitio proximal en la regulación de P<sub>1</sub> en condiciones de deficiencia de nitrógeno y sugiere que la unión de NtcA a este sitio tiene un papel directo en la autorregulación de *ntcA*, lo cual es consistente con el fenotipo de la estirpe CSEL8, en la que sólo está el sitio de unión de NtcA proximal y sí se observa el incremento de fluorescencia GFP localizado en los proheterocistos. Por otra parte, la ocupación del sitio proximal por NtcA podría interferir en la actividad de P<sub>2</sub>, ya que en el mutante CSEL10 se observa mayor cantidad de transcrito -136 que en la estirpe CSEL6. El análisis del extremo 5' de los transcritos *gfp* en la estirpe CSEL11, generados a partir del P<sub>ntcA</sub> con mutación en el sitio distal, muestra que la inducción de la expresión desde el TSP -49 se mantiene en el tiempo hasta al menos 24 h en deficiencia de nitrógeno.

Entre los promotores activados por NtcA de genes del desarrollo de los heterocistos caracterizados hasta la fecha encontramos algunos que tienen estructura de promotores bacterianos de Clase II en los que el sitio de unión del regulador solapa con la caja -35, como *hetC*, *devBCA*, *glnA* o *nrrA* (Tabla 1.2). También se han descrito genes cuyos promotores presentan estructura de

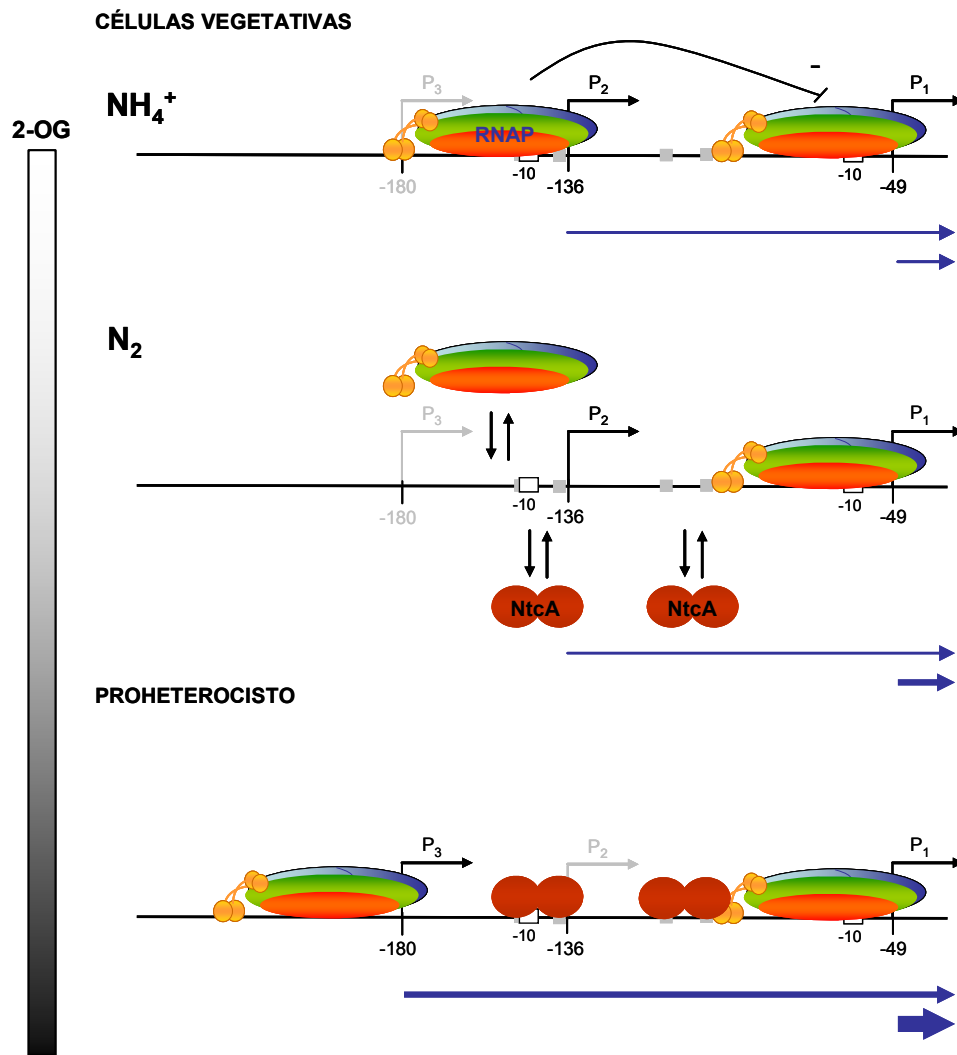
Clase I, como por ejemplo *cphBA1*, en los que el sitio de unión del regulador se sitúa por delante de la caja -35, habitualmente próximo a las posiciones -61, -71, -81 ó -91, de forma que la proteína se sitúa en la misma cara del DNA que la RNA polimerasa. También se encuentran promotores como los de *cox2* y *cox3* que podrían ser regulados por mecanismos de Clase III, en los que el sitio de unión de NtcA está por delante de la posición -91, por lo que se requieren otros reguladores (Busby y Ebright, 1999; Barnard *et al.*, 2004). En el caso del  $P_{ntcA}$ , el sitio de unión de NtcA distal (centrado en -94,5 respecto al TSP<sub>1</sub>) se localiza en la posición observada en promotores de Clase I. El proximal, sin embargo, no se localiza en la posición habitual de promotores activados por NtcA de Clase I ni de Clase II. Dado que los sitios están a una distancia de 40 pb el uno del otro, los dos dímeros de NtcA quedarían situados en la misma cara del DNA, por lo que podría existir un efecto cooperativo en la unión del regulador a ambos sitios. Por otra parte, la unión de NtcA al sitio distal, que genera una ventana de protección que abarca aproximadamente desde -18 a +8 respecto al TSP -136 (Fig. 3.28), podría tener un papel represor sobre P<sub>2</sub> de modo que la ocupación de este sitio por NtcA sería incompatible con la unión de la RNA polimerasa a P<sub>2</sub>.

En base a estas consideraciones, se propone el modelo de regulación de *ntcA* en *Anabaena* sp. PCC 7120 que se presenta a continuación (Fig. 4.2):

En condiciones de crecimiento con amonio, el gen *ntcA* se expresaría desde el promotor constitutivo P<sub>2</sub> y el componente basal de P<sub>1</sub>. La actividad de estos promotores es independiente de NtcA y de HetR y genera los transcritos -49 y -136 que se detectan en las células de la estirpe silvestre cultivadas en presencia de amonio, así como en las estirpes mutantes *ntcA* y *hetR* cuando se cultivan tanto en presencia como en ausencia de nitrógeno combinado (Muro-Pastor *et al.*, 2002).

En condiciones de deficiencia de nitrógeno, el aumento de concentración celular de 2-OG activaría la proteína NtcA, presente a bajos niveles. La proteína NtcA activada podría unirse al sitio proximal y/o distal, compitiendo en este último caso con la unión de la RNA polimerasa al P<sub>2</sub>.

El incremento localizado de HetR en las células que se están diferenciando promovería la activación transitoria de P<sub>3</sub>. El hecho de que la inducción de la expresión desde P<sub>3</sub> y P<sub>1</sub> tenga lugar simultáneamente sugiere que la transcripción desde estos promotores podría estar acoplada a una situación fisiológica particular o a un tipo celular. El requerimiento de P<sub>3</sub> para la inducción de P<sub>1</sub> podría estar relacionado con la eliminación del “elemento represor” de P<sub>1</sub> localizado en el fragmento de -182 a -143. La transcripción desde P<sub>3</sub>, eliminando a dicho elemento negativo, produciría un aumento en células localizadas de la transcripción de *ntcA*. El aumento de la concentración de NtcA en los proheterocistos tendría como consecuencia la ocupación del sitio de unión proximal quizá sinérgicamente con el sitio distal, lo que tendría un efecto positivo autorregulatorio en la expresión de P<sub>1</sub>. Según este modelo, la regulación de P<sub>1</sub> por HetR durante el proceso de diferenciación (Muro-Pastor *et al.*, 2002) podría tener lugar vía la activación de P<sub>3</sub> en células concretas.



**Figura 4.2. Modelo de activación de la región promotora de *ntcA* en las células vegetativas y en células en proceso de desarrollo en respuesta a la deficiencia de nitrógeno.** Ver texto. Se representa esquemáticamente la región promotora de *ntcA*. Se señala la situación aproximada de los sitios de inicio de la transcripción (-49, -136 y -180), las cajas -10 y los sitios de unión de NtcA (hemisítios, ■). Los promotores (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> o P<sub>3</sub>) que se están utilizando en cada caso se indican en negro y los no operativos en gris. Las flechas horizontales azules corresponden a los transcritos. El grosor indica la abundancia relativa aproximada de los productos de extensión. El rectángulo vertical gris-negro situado a la izquierda representa la concentración intracelular de 2-OG (de menor concentración, blanco, a mayor concentración, negro).

En experimentos de extensión de un cebador realizados con RNA aislado de heterocistos se muestra que el promotor más utilizado en las células diferenciadas es el P<sub>1</sub> (Ramasubramanian *et al.*, 1996; Muro-Pastor *et al.*, 2002). Eventualmente, NtcA podría alcanzar una concentración en los proheterocistos y heterocistos suficiente para ocupar el posible sitio de unión localizado en torno al TSP -180 (Fig. 3.28), reprimiendo al P<sub>3</sub>, lo que podría explicar la transitoriedad de la expresión de



este promotor. Por otra parte, la presencia de NtcA en los sitios distal y proximal podría por un lado dificultar el acceso de la RNA polimerasa al P<sub>2</sub> y por otro activar la expresión desde P<sub>1</sub>.

En el modelo propuesto, los dos elementos principales que intervienen en el cambio del patrón de expresión desde los promotores de *ntcA* serían (1) la transcripción desde P<sub>3</sub> promovida por HetR mediante mecanismos que desconocemos y que podrían incluir la eliminación de un represor o la presencia de un activador (por ejemplo, un factor sigma específico de los proheterocistos), y (2) la activación de P<sub>1</sub> mediada por NtcA.

El análisis comparativo de la región promotora de *ntcA* de las estirpes cianobacterianas formadoras de heterocistos de cuyo genoma secuenciado se dispone (Fig. 4.3) muestra que existe un alto grado de conservación en la secuencia correspondiente a los promotores P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>. Esto sugiere que el mecanismo de regulación de la expresión de *ntcA* en estas cianobacterias podría estar conservado, al menos a nivel de P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>. La zona anterior al P<sub>3</sub> sólo presenta algunas secuencias comunes, que podrían constituir un elemento de regulación común, entre las cuatro estirpes analizadas.

A. PCC7120	CCTACACCCTTATCCAAACCC--TTTATCTTTGTTTATACATGGTTAGCAAAAATGATG
A. variabilis	CCTACACCCTTATCCAAACCC--TTTATCTTTGTTTATACATAGTTAGCAAAAATGATG
N. punctiforme	-----CTAGAATCTGAGGCACGTTTGTCTTTGTTTATACAGGATTGCAAAAATGAAT
Nodularia	ACAATACTAGAATCTGAGGCAGTTTGTCTTGTCTTGCACATAATTGCAAAAATGATG
	* * * * *
A. PCC7120	ATTATTAAGGGCGTTTTTTAGATAAAATGTTGTTATT-TCTTAAGATATTTTCAAGAT
A. variabilis	ATTATTAAGGGCGTTTTTTAGATAAAATGTTGTTATT-TCTTAAGATATTTTCAAGAT
N. punctiforme	ATTGAGAAGGGCGTTTGTCTATGACAAAAATCTTGATTTTCTTAAAGATTTTCTCAAGAT
Nodularia	ATCAGGAGAACTGTTTCTGAAAAGTTTCTCCAGATAAT-CCTGAAGATATTCTCAAGAT
	** * * * *
A. PCC7120	TACTTAATTT-TTTCTGCAAAAAACCTGATGGTTAGAGAAAGTAGAAGTATCTAAGA
A. variabilis	TACTTAATTT-TTTCTGCAAAAAACCTGATGGTTAGAGAAAGTAGAAGTATCTAAGA
N. punctiforme	ATCTTTATTTGTTCTTTAAAAAACCCCTTTTAAATACAGTTATTGGAACTACTTATCAACA
Nodularia	ATCGTGAACT-TTTTGGGAAAAACCTGACGACCAACTGTGCGAGA-ACTTAT-AACA
	* * * * *
A. PCC7120	ACTGCTAGCTAAAAATAGTAAAAATTTGGGTATCATTATGAACAAATAACCATAAAGTTGT
A. variabilis	ACTGCTAGCTAAAAATAGTAAAAATTTGGGTATCATTATGAACAAATAACCATAAAGTTGT
N. punctiforme	ATTAGTAGCTGAAAGGATCAACAATTATGTATCATTATAAACAACAGTTATGAAGCGAT
Nodularia	ACTACTAGCTAAAAACAGCAAAAATTATGTATCATTATGAACAAATAACTATGAAGTTAT
	* * * * *
A. PCC7120	ACGTTTGAGTATAGGAAAGTACAGAAAGGTTAACGGTGCTTTATTGATTTTTCAGGTGTA
A. variabilis	ACGTTTGAGTATAGGAAAGTACAGAAAGGTTAACGGTGCTTTATTGATTTTTCAGGTGTA
N. punctiforme	TAGTTTGAGTATAGGAAAGTACAGAAAGGTTGACGGTGCTTTATTGATTTTTCAGGTGTA
Nodularia	GGATTGAGTATAGGAATGTACAGAAAGGTTGACGGTGCTTTATTGATTTTTCAGGTGTA
	*****
A. PCC7120	TTCTTAGGTAATTAGTTTTTTAGTTTTTTGTTATCCGGCATTGGGTAGGGGAAGGGAGAT
A. variabilis	TTCTTAGGTAATTAGTTTTTTAGTTTTTTGTTATCCGGCATTGGGTAGGGGAAGGGAGAT
N. punctiforme	TTCTTAGGTAATCAGT-----TTTGTGTTTCCGGCATTGGGTAGGGGAAGGGAGAT
Nodularia	TTCTTAGGTAATCAGT-----TTTGTGTTTCCGGCATTGGGTAGGGGAAGGGAGAT
	*****

**Figura 4.3. Análisis comparativo de la secuencia de nucleótidos de la región promotora de *ntcA* de las estirpes cianobacterianas filamentosas formadoras de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Nostoc punctiforme* y *Nodularia spumigena*.** La comparación y alineamiento de las secuencias se realizó con el programa "CLUSTALW". Los nucleótidos conservados en todas las estirpes se señalan con un asterisco. Se indican los sitios de inicio de la transcripción (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub>), la posible caja -10 de cada promotor y la posible caja -35 de P<sub>2</sub> (en rojo), los sitios de unión de NtcA (cajas grises) y el inicio de la traducción del gen (+1).

Las pruebas acumuladas del análisis de la actividad de diversos promotores indican que, bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno y específicamente durante el proceso de diferenciación, los heterocistos son células transcripcionalmente activas que presentan patrones de expresión que producen el incremento localizado de ciertos transcritos, como por ejemplo *hetR*, *patS*, *hetC*, *devBCA*, *xisA* o *nifHDK*. El mecanismo molecular que opera el establecimiento de los diferentes patrones de expresión se desconoce en gran medida, pero no se puede ignorar el hecho de que existen múltiples genes que se expresan de forma diferencial. Las regiones promotoras de los genes que se transcriben en ambos tipos celulares, células vegetativas y heterocistos, contendrían promotores en tándem, como de hecho ocurre en los genes *glnA* (Frías *et al.*, 1994; Tumer *et al.*, 1983; Valladares *et al.*, 2004) y *petH* (Valladares *et al.*, 1999), de forma que la expresión diferencial entre los dos tipos celulares tuviera lugar desde combinaciones promotoras distintas. El uso de estas diferentes combinaciones promotoras podría estar mediado por complejos transcripcionales específicos de cada tipo celular (por ejemplo, con factores sigma diferentes).

### 4.3. IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS PROTEÍNAS INDUCIDAS DURANTE EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE LOS HETEROCISTOS

Con objeto de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de control del proceso de diferenciación de los heterocistos, llevamos a cabo la búsqueda de posibles elementos reguladores mediante un análisis del subproteoma correspondiente a la fracción de proteínas que tienen afinidad por la heparina-sefarosa de filamentos de *Anabaena* sp. PCC 7120 sometidos a deficiencia de nitrógeno. El hecho de que, en general, las proteínas que participan en la regulación de la transcripción sean poco abundantes no favorece la búsqueda, y además, en el caso concreto de que éstas estuvieran implicadas exclusivamente en el desarrollo de los heterocistos, existe la posibilidad de que sólo estuvieran presentes en las células que se están diferenciando (aproximadamente una décima parte de las células del filamento). Sin embargo, dado que en el análisis realizado identificamos proteínas reguladoras del proceso de diferenciación, como DevH, las proteínas implicadas en el desarrollo de los heterocistos parecen estar suficientemente representadas en la muestra. Aunque con la matriz de heparina interaccionarían preferentemente proteínas de unión a los ácidos nucleicos, en nuestro análisis proteómico se han identificado también proteínas que podrían haber interaccionado con la heparina porque interaccionen *in vivo* con el peptidoglicano, como podría ser el caso de la fosfoglucomutasa/fosfomanomutasa o de una probable N-acetilmuramilo-L-alanina amidasa. La obtención de estas proteínas probablemente se deba a la

naturaleza de la matriz de heparina, que consiste en un polímero de repeticiones de disacáridos sulfatados de la familia de los glicosaminoglicanos.

Entre las ORFs identificadas destacan *alr1301*, *all1692*, *all1872*, *all2004*, *all4252* y *alr4877*, cuya expresión no se detecta, o tiene lugar a un nivel muy bajo, en presencia de amonio y se induce en deficiencia de nitrógeno (Fig. 3.35A; Tabla 4.1).

**Tabla 4.1. Genes inducibles en deficiencia de nitrógeno cuya expresión es indetectable o muy baja en amonio.**

Gen	Identidad y/o posible función de la proteína
<i>alr1301</i>	Desconocida; es exclusiva de cianobacterias formadoras de heterocistos
<i>all1692</i>	SigC, subunidad sigma RNA polimerasa (Brahamsha y Haselkorn, 1992)
<i>all1872</i>	Posible ATPasa de la familia AAA+
<i>all2004</i>	ATPasa de tipo P transportadora de cationes
<i>all4252</i>	Posible óxido-reductasa; tiene dos dominios óxido-reductasa
<i>alr4877</i>	Desconocida; posible proteína de la pared celular exclusiva de cianobacterias formadoras de heterocistos; en su segunda mitad, la proteína presenta dominios WD-40 de interacción entre proteínas

El gen *alr1301* determina una posible proteína de 219 aminoácidos con un pI teórico de 5,3. El análisis informático no identifica ningún motivo o dominio conocido que permita especular sobre su posible función. La búsqueda en las bases de datos permite identificar posibles homólogos de *alr1301* únicamente en los genomas de las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos *Anabaena variabilis* y *Nodularia spumigena*, pero no en *Nostoc punctiforme*.

SigC, determinado por *all1692*, ha sido el único factor sigma identificado en el análisis proteómico, lo cual no descarta la posible participación de otros factores sigma durante el proceso de diferenciación. En estudios previos realizados por Brahamsha y Haselkorn (1992) se determinó que *sigC* se expresa de forma transitoria en condiciones de deficiencia de nitrógeno y recientemente se ha confirmado que esta expresión tiene lugar de forma localizada en las células que se están diferenciando (Aldea *et al.*, 2007).

La ORF *all1872* determina un posible ATPasa de clase AAA+ (ATPasas asociadas a diversas actividades celulares). La proteína está muy conservada entre las cianobacterias y otros organismos, encontrándose diversos homólogos en *Anabaena* sp. PCC 7120. La familia de ATPasas de clase AAA+ constituye un grupo muy amplio de proteínas funcionalmente diverso presente en los distintos grupos de seres vivos (Hanson y Whiteheart, 2005). Están implicadas en muchos procesos celulares y actúan provocando cambios conformacionales o remodelación de las proteínas diana. En muchos casos esta remodelación perturba la estructura de la proteína de forma que conduce a su desplegamiento. Son cruciales para la proteólisis, en la que su papel consiste en desplegar las proteínas para permitir la acción de las proteasas. Por tanto, esta proteína podría ser importante en la proteólisis asociada al desarrollo de los heterocistos (Fleming y Haselkorn, 1974).

En el análisis proteómico se detectó otra proteasa de la familia AAA+, ClpP (subunidad proteolítica), determinada por el gen *alr1238* (Fig. 3.35B; Tabla 4.2). Algunos autores agrupan estas proteasas con proteínas relacionadas con estrés (Ran *et al.*, 2007) o con chaperonas (Hanson y Whiteheart, 2005). En nuestro análisis, también aparecen dos chaperonas (*all4092* y *all4144*), y todas estas proteínas podrían tener un papel en la adaptación a la deficiencia en nitrógeno.

El gen *all2004* está enmarcado en una agrupación constituida por las ORFs *all2002* a *all2006*, cuya expresión se induce significativamente durante el proceso de diferenciación (Ehira *et al.*, 2003; Ehira y Ohmori, 2006a). Exceptuando *all2004*, que determinaría una ATPasa de tipo P transportadora de cationes, no se identifican posibles funciones para las demás (Kaneko *et al.*, 2001). Las ATPasas de tipo P están ampliamente distribuidas en los seres vivos y se agrupan como una superfamilia de bombas de iones primarias, las cuales transportan cationes a través de la bicapa lipídica a expensas de la hidrólisis de ATP. El hallazgo de esta proteína en nuestro estudio es de gran interés dado el posible papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en el desarrollo del heterocisto (véase la Introducción). Sería de gran interés estudiar si esta P-ATPasa es un transportador de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Otro gen inducido cuya expresión no se detecta en células creciendo con amonio es *all4252*. Esta ORF determina una posible óxido-reductasa de función desconocida que está muy conservada entre las cianobacterias. En experimentos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, se identificó All4252 como una proteína con elevada afinidad por heparina presente en el extracto crudo de células de la estirpe silvestre incubadas 6 h en deficiencia de nitrógeno que no aparecía en extractos similares de la estirpe mutante 216 (*hetR*) (A. M. Muro-Pastor y A. Valladares, no publicado).

La ORF *alr4877* determina una proteína de 598 aminoácidos, de función desconocida, que presenta 7 dominios WD-40 localizados en la segunda mitad de la proteína. Entre las cianobacterias de cuyo genoma secuenciado se dispone, sólo hay homólogos de la proteína completa en las estirpes filamentosas formadoras de heterocistos *Anabaena variabilis* y *Nostoc punctiforme*, pero no en *Nodularia spumigena*. Las proteínas pertenecientes a la familia WD-40 se definen por contener de 4 a 16 unidades constituidas por secuencias repetidas de unos 40-60 aminoácidos que habitualmente comienzan con un dímero de glicina-histidina (GH) y terminan con una pareja de triptófano-ácido aspártico (WD) (Neer *et al.*, 1994). Su mecanismo de acción implicaría la interacción con otras proteínas (Neer *et al.*, 1994). En cianobacterias, sólo en *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ha descrito la posible función de una proteína de la familia WD que estaría implicada en el control del sistema de transporte de bicarbonato de alta afinidad (Hisbergues *et al.*, 2001).

**Tabla 4.2. Genes inducibles en deficiencia de nitrógeno con expresión apreciable en amonio**

Gen	Identidad y/o posible función de la proteína
alr1238	Proteasa Clp dependiente de ATP, subunidad proteolítica
all1239	Desconocida
alr1240	Posible ribonucleasa R (exorribonucleasa II)
all1338	Desconocida; con un posible dominio de unión a DNA
alr1700	Desconocida
alr1810	Desconocida; es exclusiva de cianobacterias formadoras de heterocistos
alr3832	Factor de iniciación de la traducción IF-2
all3953	Regulador transcripcional de la familia LysR
all4092	Desconocida; posible chaperona relacionada con procesos de exportación
all4294	Probable N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (proteína de unión al peptidoglicano)
all4623	Factor de iniciación de la traducción IF-3
alr7083	Proteína de la familia ParB de segregación de plásmidos o cromosomas (el gen <i>alr7083</i> está localizado en el plásmido $\alpha$ )

En la Tabla 4.2 se resumen los genes, correspondientes a proteínas identificadas en el análisis proteómico, cuya expresión se detecta en cultivos con amonio e incrementa durante el proceso de diferenciación de los heterocistos. De especial interés son aquellos que determinan proteínas de función desconocida (*all1239*, *alr1338*, *alr1700*, *alr1810* y *all4092*), entre las que cabe destacar Alr1810 que sólo está presente en cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos. En *Anabaena* sp. PCC 7120 hay una proteína homóloga a Alr1810 que también se obtuvo en el análisis proteómico. Es una posible proteína de la pared celular exclusiva de cianobacterias formadoras de heterocistos codificada por la ORF *all7185* (Tabla 3.6). También se han determinado tres posibles proteínas reguladoras: PlmA, de la familia GntR de reguladores transcripcionales, que parece afectar al número de copias de plásmidos de *Anabaena*, descrita por Lee *et al.* (2003); All3953, también muy conservada, perteneciente a la familia LysR de reguladores transcripcionales; y All1338, proteína conservada con una región rica en ácido glutámico, que presenta un dominio de unión al DNA. Se ha descrito un mutante de *all1338* que presenta fenotipo Fox<sup>-</sup> (no fija nitrógeno en condiciones aeróbicas) (Wolk, 2005).

El análisis informático de las proteínas identificadas predice que varias de ellas podrían tener localización extracitoplasmática (All4294, All7185 y Alr4877), por lo que podrían interaccionar con el peptidoglicano. La probable N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (All4294), que podría estar implicada en el metabolismo del peptidoglicano, también se identificó en el análisis proteómico de la membrana externa realizado por Moslavac *et al.* (2005). Por otro lado, se ha descrito que la proteína HcwA (también una probable N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa) se requiere para el desarrollo de los heterocistos (Zhu *et al.*, 2001). La obtención de proteínas extracitoplasmáticas y del metabolismo del peptidoglicano en el análisis de proteínas inducidas en células sometidas a deficiencia de nitrógeno puede indicar un activo metabolismo del peptidoglicano durante el proceso de desarrollo, lo que constituye un tema de gran interés (Lázaro *et al.*, 2001; Leganés *et al.*, 2005).

## *Discusión*

En resumen, el análisis proteómico realizado en esta tesis ha permitido identificar una serie de elementos que pueden ser importantes para el desarrollo de los heterocistos y/o para el mantenimiento del crecimiento diazotrófico, y que merecerán ser estudiados en el futuro.

## **5. CONCLUSIONES**





## 5. CONCLUSIONES

1. El aumento de la expresión de *ntcA* que tiene lugar durante el proceso de diferenciación de los heterocistos en *Anabaena* sp. PCC 7120 se localiza principalmente en los proheterocistos. Este incremento en la concentración de transcrito y proteína en células concretas del filamento parece ser la base de un mecanismo de regulación diferencial de genes específicos del desarrollo de los heterocistos.
2. La sobreexpresión de NtcA en *Anabaena* sp. PCC 7120 no es suficiente para promover, en condiciones represoras, la inducción de la expresión de genes que son activados por NtcA. Así, además de la regulación a nivel de expresión génica, NtcA también está controlada a nivel de actividad, siendo necesarios unos requerimientos metabólicos concretos (ausencia de nitrógeno combinado) para que ejerza su función como activador transcripcional. Sin embargo, el efecto represor de NtcA se observa tanto en presencia como en ausencia de nitrógeno combinado.
3. El efecto del regulador positivo del desarrollo de los heterocistos HetR sobre algunos promotores, como el del operón *devBCA*, puede tener lugar vía NtcA. Sin embargo, HetR actúa también a otros niveles, ya que en una estirpe que sobreexpresa NtcA no se promueve la expresión de operones como *cox2* o *nifHDK* en ausencia de una proteína HetR silvestre.
4. La región promotora de NtcA presenta, al menos, dos sitios de unión de NtcA, habiéndose determinado experimentalmente en este trabajo la localización del sitio centrado en -103,5 pb respecto al inicio del gen. NtcA presenta mayor afinidad por el sitio de unión situado a -143,5 pb, teniendo el 2-oxoglutarato un efecto positivo en la unión de NtcA a ambos.
5. La expresión diferencial de *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 según las condiciones de nitrógeno del medio y el tipo celular deriva de la actividad regulada de sus tres promotores. El aumento en la utilización de P<sub>1</sub> durante el proceso de diferenciación requiere la presencia de P<sub>3</sub> y se afecta negativamente por la presencia de un elemento no determinado localizado en la región de -182 a -143 respecto del codón de iniciación del gen. Por otra parte, el incremento localizado de la expresión de *ntcA* en los proheterocistos requiere la expresión desde P<sub>3</sub> y P<sub>1</sub> pero no desde P<sub>2</sub>.

## **Conclusiones**

6. Mediante análisis proteómico y transcripcional se han identificado varias proteínas cuya expresión aumenta durante el proceso de diferenciación de los heterocistos. Las proteínas AlI3953 y AlI1338, que presentan dominios de interacción con el DNA, podrían intervenir en la regulación del proceso de desarrollo. Las proteínas Alr1301, Alr1810 y Alr4877 de función desconocida, son exclusivas de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos. Otras proteínas inducidas de interés son una ATPasa de tipo P transportadora de cationes (AlI2004) y una probable N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (AlI4294).

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D. G. (2000) Symbiotic Interactions. En Whitton B. A. y Potts M. (eds), *The Ecology of Cyanobacteria, Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 523-561.
- Alberte, R. S., Tel-Or E., Packer L. y Thornber J. P. (1980) Functional organization of the photosynthetic apparatus in heterocysts of nitrogen-fixing cyanobacteria. *Nature* 284: 481-483.
- Aldea, M. R., Mella-Herrera R. A. y Golden J. W. (2007) Sigma factor genes *sigC*, *sigE*, and *sigG* are upregulated in heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 189: 8392-8396.
- Aldehni, F. M., Sauer J., Spielhauer C., Schmid R. y Forchhammer K. (2003) Signal transduction protein P(II) is required for NtcA-regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 185: 2582-2591.
- Allen, M. M. (1984) Cyanobacterial cell inclusions. *Annu. Rev. Microbiol.* 38: 1-25.
- Almon, H. y Böhme. H. (1980) Components and activity of the photosynthetic electron transport system of intact heterocysts isolated from the blue-green alga *Nostoc muscorum*. *Biochim. Biophys. Acta* 592: 113-120.
- Altschul, S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. y Lipman D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Amann, E., Ochs B. y Abel K. J. (1988) Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69: 301-315.
- Ausubel, F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. y Struhl, K. (2006) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley Interscience, N.Y.
- Barnard, A., Wolfe A. y Busby S. (2004) Regulation at complex bacterial promoters: how bacteria use different promoter organizations to produce different regulatory outcomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 102-108.
- Bauer, C. C., Ramaswamy K. S., Endley S., Scappino L. A., Golden J. W. y Haselkorn R. (1997) Suppression of heterocyst differentiation in *Anabaena* PCC 7120 by a cosmid carrying wild-type genes encoding enzymes for fatty acid synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 151: 23-30.
- Bauer, C. C., Scappino L. y Haselkorn R. (1993) Growth of the cyanobacterium *Anabaena* on molecular nitrogen: NifJ is required when iron is limited. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8812-8816.
- Black, K., Buikema W. J. y Haselkorn R. (1995) The *hglK* gene is required for localization of heterocyst-specific glycolipids in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 177: 6440-6448.
- Black, T. A., Cai Y. y Wolk C. P. (1993) Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Mol. Microbiol.* 9: 77-84.
- Black, T. A. y Wolk C. P. (1994) Analysis of a *Het<sup>-</sup>* mutation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing. *J. Bacteriol.* 176: 2282-2292.
- Bodyl, A., Mackiewicz P. y Stiller J. W. (2007) The intracellular cyanobacteria of *Paulinella chromatophora*: endosymbionts or organelles? *Trends Microbiol.* 15: 295-296.

## Bibliografía

- Böhme, H. (1987) Regulation of electron flow to nitrogenase in a cell-free system from heterocysts of *Anabaena variabilis*. *Biochem. Biophys. Acta* 891: 121-128.
- Böhme, H. (1998) Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. *Trends Plant Science*. 3: 346-351.
- Böhme, H. y Haselkorn R. (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the gene coding for heterocyst ferredoxin from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Gen. Genet.* 214: 278-285.
- Bolívar, F., Rodríguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heyneker H. L. y Boyer H. W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113.
- Borthakur, D. y Haselkorn R. (1989) Tn5 mutagenesis of *Anabaena* sp. strain PCC 7120: isolation of a new mutant unable to grow without combined nitrogen. *J. Bacteriol.* 171: 5759-5761.
- Boyer, H. W. y Roulland-Dussoix D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bradley, S. y Carr. N. G. (1971) The absence of functional photosystem II in heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *J. Gen. Microbiol.* 68: xiii-xiv.
- Brahamsha, B. y Haselkorn R. (1991) Isolation and characterization of the gene encoding the principal sigma factor of the vegetative cell RNA polymerase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 173: 2442-2450.
- Brahamsha, B. y Haselkorn R. (1992) Identification of multiple RNA polymerase sigma factor homologs in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: cloning, expression, and inactivation of the *sigB* and *sigC* genes. *J. Bacteriol.* 174: 7273-7282.
- Browning, D. F. y Busby S. J. (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 57-65.
- Brusca, J. S., Chastain C. J. y Golden J. W. (1990) Expression of the *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *xisA* gene from a heterologous promoter results in excision of the *nifD* element. *J. Bacteriol.* 172: 3925-3931.
- Bryce, T. A., Welti D., Walsby A. E. y Nichols B. W. (1972) Monohehexose derivatives of long-chain polyhydroxyl alcohols: a novel class of glycolipid specific to heterocystous algae. *Phytochemistry* 11: 295-302.
- Buick, R. (1992) The antiquity of oxygenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-deficient Archaean lakes. *Science* 255: 74-77.
- Buikema, W. J. y Haselkorn R. (1991a) Isolation and complementation of nitrogen fixation mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 173: 1879-1885.
- Buikema, W. J. y Haselkorn R. (1991b) Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Gen. Dev.* 5: 321-330.
- Buikema, W. J. y Haselkorn R. (2001) Expression of the *Anabaena hetR* gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2729-2734.
- Bullock, W. O., Fernández J. M. y Short J.M. (1987) XL-1Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376-378.

- Busby, S. y Ebright R. H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* 293: 199-213.
- Cai, Y. P. y Wolk C. P. (1990) Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J. Bacteriol.* 172: 3138-3145.
- Cai, Y. y Wolk C. P. (1997) *Anabaena* sp. strain PCC 7120 responds to nitrogen deprivation with a cascade-like sequence of transcriptional activations. *J. Bacteriol.* 179: 267-271.
- Callahan, S. M. y Buikema W. J. (2001) The role of HetN in maintenance of the heterocyst pattern in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 40: 941-950.
- Campbell, E. L., Cohen M. F. y Meeks J. C. (1997) A polyketide-synthase-like gene is involved in the synthesis of heterocyst glycolipids in *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133. *Arch. Microbiol.* 167: 251-258.
- Campbell, E. L., Hagen K. D., Cohen M. F., Summers M. L. y Meeks J. C. (1996) The *devR* gene product is characteristic of receivers of two-component regulatory systems and is essential for heterocyst development in the filamentous cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133. *J. Bacteriol.* 178: 2037-2043.
- Cardemil, L. y Wolk C. P. (1979) The polysaccharides from heterocyst and spore envelopes of a blue-green alga. Structure of the basic repeating unit. *J. Biol. Chem.* 254: 736-741.
- Carrasco, C. D., Buettner J. A. y Golden J. W. (1995) Programed DNA rearrangement of a cyanobacterial *hupL* gene in heterocysts. *Proc. Natl. Acad. USA.* 92: 791-795.
- Carrasco, C. D., Ramaswamy K. S., Ramasubramanian T. S. y Golden J. W. (1994) *Anabaena xisF* gene encodes a developmentally regulated site-specific recombinase. *Genes Dev.* 8: 74-83.
- Chastain, C. J., Brusca J. S., Ramasubramanian T. S., Wei T.-F. y Golden J. W. (1990) A sequence-specific DNA-binding factor (VF1) from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 vegetative cells binds to three adjacent sites in the *xisA* upstream region. *J. Bacteriol.* 172: 5044-5051.
- Chenna, R., Sugawara H., Koike T., López R., Gibson T., Higgins J., Desmond G. y Thompson J. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 31: 3497-3500.
- Cormack, B. P., Valdivia R. H. y Falkow S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38.
- Curatti, L., Flores E. y Salerno G. (2002) Sucrose is involved in the diazotrophic metabolism of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *FEBS Lett.* 513: 175-178.
- Curtis, S. E. y Martin J. A. (1994) The transcription apparatus and the regulation of transcription initiation. En Bryant D. A. (ed), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 613-639.
- Dean, D. R., Bolin J. T. y Zheng L. (1993) Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. *J. Bacteriol.* 175: 6737-6744.
- DeRuyter, Y. S. y Fromme P. (2008) Molecular Structure of the Photosynthetic Apparatus. En Herrero A. y Flores E. (eds), *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Caister Academic Press, Norfolk. pp 217-269.
- Donze, M., Haveman J. y Schiereck P. (1972) Absence of photosystem 2 in heterocysts of the blue-green alga *Anabaena*. *Bioch. Biophys. Acta* 256: 157-161.
- Ehira, S. y Ohmori M. (2006a) NrrA, a nitrogen-responsive response regulator facilitates heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 59: 1692-1703.

## Bibliografía

- Ehira, S. y Ohmori M. (2006b) NrrA directly regulates expression of *hetR* during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 188: 8520-8525.
- Ehira, S., Ohmori M. y Sato N. (2003) Genome-wide expression analysis of the responses to nitrogen deprivation in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* 10: 97-113.
- Elhai, J. y Wolk C. P. (1988a) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167: 747-754.
- Elhai, J. y Wolk C. P. (1988b) A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* 68: 119-138.
- Elhai, J. y Wolk C. P. (1990) Developmental regulation and spatial pattern of expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBO J.* 9: 3379-3388.
- Elhai, J., Vepriksiy A., Muro-Pastor A. M., Flores E. y Wolk C. P. (1997) Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 179: 1998-2005.
- El-Shehawy, R., Lugomela C., Ernst A. y Bergman B. (2003) Diurnal expression of *hetR* and diazocyte development in the filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*. *Microbiology* 149: 1139-1146.
- Engelke, D. R., Krikos A., Bruck M. E. y Ginsburg D. (1990) Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 191: 396-400.
- Ernst, A., Black T., Cai Y., Panoff J. M., Tiwari D. N. y Wolk C. P. (1992) Synthesis of nitrogenase in mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 affected in heterocyst development or metabolism. *J. Bacteriol.* 174: 6025-6032.
- Ezaz-Nikpay, K., Uchino K., Lerner R. E. y Verdine G. L. (1994) Construction of an overproduction vector containing the novel *srp* (sterically repressed) promoter. *Protein Sci.* 3: 132-138.
- Fan, Q., Lechno-Yossef S., Ehira S., Kaneko T., Ohmori M., Sato N., Tabata S. y Wolk C. P. (2006) Signal transduction genes required for heterocyst maturation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 188: 6688-6693.
- Fay, P. (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* 56: 340-373.
- Fernández-Piñas, F., Leganés F. y Wolk C. P. (1994) A third genetic locus required for the formation of heterocysts in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 176: 5277-5283.
- Fiedler, G., Arnold M., Hannus S. y Maldener I. (1998) The DevBCA exporter is essential for envelope formation in heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 27: 1193-1202.
- Fiedler, G., Muro-Pastor A. M., Flores E. y Maldener I. (2001) NtcA-dependent expression of the *devBCA* operon, encoding a heterocyst-specific ATP-binding cassette transporter in *Anabaena* spp. *J. Bacteriol.* 183: 3795-3799.
- Fisher, R., Tuli R. y Haselkorn R. (1981) A cloned cyanobacterial gene for glutamine synthetase functions in *Escherichia coli*, but the enzyme is not adenylylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3393-3397.
- Fleming, H. y Haselkorn R. (1974) The program of protein synthesis during heterocyst differentiation in nitrogen-fixing blue-green algae. *Cell* 3: 169-170.



- Flores, E. y Herrero, A. (1994) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En Bryant D. A. (ed), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 487-517.
- Flores, E., Herrero A., Wolk C. P. y Maldener I. (2006) Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria? *Trends Microbiol.* 14: 439-443.
- Flores, E., Pernil R., Muro-Pastor A. M., Mariscal V., Maldener I., Lechno-Yossef S., Fan Q., Wolk C. P. y Herrero A. (2007) Septum-localized protein required for filament integrity and diazotrophy in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 189: 3884-3890.
- Fogg, G. E. (1949) Growth and heterocyst production in *Anabaena cylindrica* Lemm. II. In relation to carbon and nitrogen metabolism. *Ann. Bot.* 13: 241-259.
- Forchhammer, K. (1999) The P<sub>II</sub> protein in *Synechococcus* PCC 7942 senses and signals 2-oxoglutarate under ATP-replete conditions. En Peschek, G.A., Löffelhardt W. y Schmetterer G. (eds), *The Phototrophic Prokaryotes*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp 549-553.
- Forchhammer, K. (2004) Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 319-333.
- Frías, J. E., Flores E. y Herrero A. (1994) Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 14: 823-832.
- Frías, J. E., Flores E. y Herrero A. (1997) Nitrate assimilation gene cluster from the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 179: 477-486.
- Frías, J. E., Flores E. y Herrero A. (2000) Activation of the *Anabaena nir* operon promoter requires both NtcA (CAP family) and NtcB (LysR family) transcription factors. *Mol. Microbiol.* 38: 613-625.
- Frías, J. E., Herrero A. y Flores E. (2003) Open reading frame *all0601* from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 represents a novel gene, *cnaT*, required for expression of the nitrate assimilation *nir* operon. *J. Bacteriol.* 185: 5037-5044.
- Frías, J. E., Mérida A., Herrero A., Martín-Nieto J. y Flores E. (1993) General distribution of the nitrogen control gene *ntcA* in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 175: 5710-5713.
- García-Domínguez, M., Reyes J. C. y Florencio F. J. (2000) NtcA represses transcription of *gifA* and *gifB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* 35: 1192-1201.
- Giddings, T. H. y Staeheling L. A. (1978) Plasma membrane architecture of *Anabaena cylindrica*: occurrence of microplasmodesmata and changes associated with heterocyst development and the cell cycle. *Cytobiologie* 16: 235-249.
- Giovannoni, S. J., Turner S., Olsen G. J., Barns S., Lane D. J. y Pace N. R. (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* 170: 3584-3592.
- Giovannoni, S. J., Wood N. y Huss V. (1992) Molecular phylogeny of oxygenic cells and organelles based on small-subunit ribosomal RNA sequences. En Lewin R. A. (ed), *Origin of plastids. Symbiogenesis, Prochlorophytes and the Origins of Chloroplasts*. Chapman y Hall, New York. pp 159-170.
- Glazer, A. N. (1987) Phycobilisomes: assembly and attachment. En Fay P. y Van Baalen (eds), *The Cyanobacteria*. Elsevier Science Publishers B. V., New York. pp 69-94.

## Bibliografía

- Golden, J. W., Carrasco C. D., Mulligan M. E., Schneider G. J. y Haselkorn R. (1988) Deletion of a 55-kilobase-pair DNA element from the chromosome during heterocyst differentiation of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 170: 5034-5041.
- Golden, J. W., Mulligan M. E. y Haselkorn R. (1987) Different recombination site specificity of two developmentally regulated genome rearrangements. *Nature* 327: 526-529.
- Golden, J. W., Ramasubramanian T. S., Wei T.-F., Pu F., Carrasco C. D. y Ramaswamy K. S. (1992) Rearrangement of *nif* operons in cyanobacterial heterocysts. Abstr. n° 48, 9<sup>th</sup> Intl. Congr. *Nitrogen Fixation*, Cancún.
- Golden, J. W., Robinson S. J. y Haselkorn R. (1985) Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena*. *Nature* 314: 419-423.
- Golden, J. W. y Wiest D. R. (1988) Genome rearrangement and nitrogen fixation in *Anabaena* blocked by inactivation of *xisA* gene. *Science* 242: 1421-1423.
- Golden, J. W., Whorff L. L. y Wiest D. R. (1991) Independent regulation of *nifHDK* operon transcription and DNA rearrangement during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 173: 7098-7105.
- Golden, J. W. y Yoon H. S. (1998) Heterocyst formation in *Anabaena*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 623-629.
- Golden, J. W. y Yoon H. S. (2003) Heterocyst development in *Anabaena*. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 557-563.
- Gralla, J. D. y Collado-Vides, J. (1996). Organization and function of transcription regulatory elements. En Neidhardt F. C., Curtis R., Ingraham J. L., Lin E. C. C., Low K. B., Magasanik B., Reznikoff W. S., Riley M., Schaechter M. y Umberger HE (eds), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp 1232-1245.
- Gray, M. W. (1989) The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.* 5: 294-299.
- Gupta, M. y Carr N. G. (1981) Enzymology of arginine metabolism in heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 12: 179-181.
- Hagen, K. D. y Meeks J. C. (2001) The unique cyanobacterial protein OpcA is an allosteric effector of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *J. Biol. Chem.* 276: 11477-11486.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hanson, P. I. y Whiteheart S. W. (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6: 519-529.
- Happe, T., Schutz K. y Böhme H. (2000) Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *J. Bacteriol.* 182: 1624-1631.
- Haselkorn, R. (1986) Organization of the genes for nitrogen fixation in photosynthetic bacteria and cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 525-547.
- Haselkorn, R., Rice D., Curtis S. E. y Robinson S. J. (1983) Organization and transcription of genes important in *Anabaena* heterocyst differentiation. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 134B: 181-193.
- Hebbar, P. B. y Curtis S. E. (2000) Characterization of *devH*, a gene encoding a putative DNA binding protein required for heterocyst function in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 182: 3572-3581.

- Herdman, M., Janvier M., Rippka R. y Stanier R. Y. (1979a) Deoxyribonucleic acid base composition of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 63-71.
- Herdman, M., Janvier M., Rippka R. y Stanier R. Y. (1979b) Genome size of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 73-85.
- Herrero, A., Muro-Pastor A. M. y Flores E. (2001) Nitrogen control in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 183: 411-425.
- Herrero, A., Muro-Pastor A. M., Valladares A. y Flores E. (2004) Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 469-487.
- Hill, D. R., Belbin T. J., Thorsteinsson M. V., Bassam D., Brass S., Ernst A., Boger P., Paerl H., Mulligan M. E. y Potts M. (1996) GlnN (cyanoglobin) is a peripheral membrane protein that is restricted to certain *Nostoc* spp. *J. Bacteriol.* 178: 6587-6598.
- Hisbergues, M., Gaitatzes C. G., Joset F., Bedu S. y Smith T. F. (2001) A noncanonical WD-repeat protein from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: structural and functional study. *Protein Sci.* 10: 293-300.
- Holland, D. y Wolk C. P. (1990) Identification and characterization of *hetA*, a gene that acts early in the process of morphological differentiation of heterocysts. *J. Bacteriol.* 172: 3131-3137.
- Houchins, J. P. (1984) The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Biochem. Biophys. Acta* 768: 227-255.
- Huang, T. C., Lin R. F., Chu M. K. y Chen H. M. (1999) Organization and expression of nitrogen-fixation genes in the aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain RF-1. *Microbiology* 145 (Pt 3): 743-753.
- Huang, X., Dong Y. y Zhao J. (2004) HetR homodimer is a DNA-binding protein required for heterocyst differentiation, and the DNA-binding activity is inhibited by PatS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4848-4853.
- Jang, J., Wang L., Jeanjean R. y Zhang C.-C. (2007) PrpJ, a PP2C-type protein phosphatase located on the plasma membrane, is involved in heterocyst maturation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 64: 347-358.
- Jiang, F., Hellman U., Sroga G. E., Bergman B. y Mannervik B. (1995) Cloning, sequencing, and regulation of the glutathione reductase gene from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *J. Biol. Chem.* 270: 22882-22889.
- Jiang, F., Mannervik B. y Bergman B. (1997) Evidence for redox regulation of the transcription factor NtcA, acting both as an activator and a repressor, in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Biochem. J.* 327 (Pt 2): 513-517.
- Jiang, F., Wisen S., Widersten M., Bergman B. y Mannervik B. (2000) Examination of the transcription factor NtcA-binding motif by in vitro selection of DNA sequences from a random library. *J. Mol. Biol.* 301: 783-793.
- Jones, K. M., Buikema W. J. y Haselkorn R. (2003) Heterocyst-specific expression of *patB*, a gene required for nitrogen fixation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 185: 2306-2314.
- Jones, K. M. y Haselkorn R. (2002) Newly identified cytochrome c oxidase operon in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 specifically induced in heterocysts. *J. Bacteriol.* 184: 2491-2499.
- Kaneko, T., Nakamura Y., Wolk C. P., Kuritz T., Sasamoto S., Watanabe A., Iriguchi M., Ishikawa A., Kawashima K., Kimura T., Kishida Y., Kohara M., Matsumoto M., Matsuno A., Muraki A., Nakazaki N., Shimpo S., Sugimoto M., Takazawa M., Yamada M., Yasuda M. y Tabata S. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* 8: 205-213; 227-253.

## Bibliografía

- Kangatharalingam, N., Prisco J. C. y Paerl H. W. (1992) Heterocyst envelope thickness, heterocyst frequency and nitrogenase activity in *Anabaena flos-aquae*: influence of exogenous oxygen tension. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2673-2678.
- Khudyakov, I. Y. y Golden J. W. (2001) Identification and inactivation of three group 2 sigma factor genes in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 183: 6667-6675.
- Khudyakov, I. Y. y Golden J. W. (2004) Different functions of HetR, a master regulator of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120, can be separated by mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 16040-16045.
- Khudyakov, I. Y. y Wolk C. P. (1996) Evidence that the *hanA* gene coding for HU protein is essential for heterocyst differentiation in, and cyanophage A-4(L) sensitivity of, *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 178: 3572-3577.
- Khudyakov, I. Y. y Wolk C. P. (1997) *hetC*, a gene coding for a protein similar to bacterial ABC protein exporters, is involved in early regulation of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 179: 6971-6978.
- Knoll, A. H. (2008) Cyanobacteria and Earth History. En Herrero A. y Flores E. (eds), *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Caister Academic Press, Norfolk. pp 1-19.
- Koksharova, O. A. y Wolk C. P. (2002) Novel DNA-binding proteins in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 184: 3931-3940.
- Korner, H., Sofia H. J. y Zumft W. G. (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 559-592.
- Kroos, L. y Yu Y. T. (2000) Regulation of sigma factor activity during *Bacillus subtilis* development. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 553-560.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lammers, P. J., Golden J. W. y Haselkorn R. (1986) Identification and sequence of a gene required for a developmentally regulated DNA excision in *Anabaena*. *Cell* 44: 905-911.
- Lang, N. J. (1965) Electron microscopic study of heterocyst development in *Anabaena azollae* Strassburger. *J. Phycol.* 1: 127-134.
- Lang, N. J. y Fay P. (1971) The heterocysts of blue-green algae II. Details of ultrastructure. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 178: 193-203.
- Laurent, S., Chen H., Bedu S., Ziarelli F., Peng L. y Zhang C.-C. (2005) Nonmetabolizable analogue of 2-oxoglutarate elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 9907-9912.
- Laurent, S., Forchhammer K., González L., Heulin T., Zhang C.-C. y Bedu S. (2004) Cell-type specific modification of PII is involved in the regulation of nitrogen metabolism in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *FEBS Lett.* 576: 261-265.
- Lázaro, S., Fernández-Piñas F., Fernández-Valiente E., Blanco-Rivero A. y Leganés F. (2001) *pbpB*, a gene coding for a putative penicillin-binding protein, is required for aerobic nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. *J. Bacteriol.* 183: 628-636.
- Lechno-Yossef, S., Fan Q., Ehira S., Sato N. y Wolk C. P. (2006) Mutations in four regulatory genes have interrelated effects on heterocyst maturation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 188: 7387-7395.

- Lee, H. M., Vázquez-Bermúdez M. F. y Tandeau de Marsac N. (1999) The global nitrogen regulator NtcA regulates transcription of the signal transducer PII (GlnB) and influences its phosphorylation level in response to nitrogen and carbon supplies in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 181: 2697-2702.
- Lee, M. H., Scherer M., Rigali S. y Golden J. W. (2003) PlmA, a new member of the GntR family, has plasmid maintenance functions in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 185: 4315-4325.
- Leganés, F., Blanco-Rivero A., Fernández-Piñas F., Redondo M., Fernández-Valiente E., Fan Q., Lechno-Yossef S. y Wolk C. P. (2005) Wide variation in the cyanobacterial complement of presumptive penicillin-binding proteins. *Arch. Microbiol.* 184: 234-248.
- Leganés, F., Fernández-Piñas F. y Wolk C. P. (1994) Two mutations that block heterocyst differentiation have different effects on akinete differentiation in *Nostoc ellipsosporum*. *Mol. Microbiol.* 12: 679-684.
- Leganés, F., Fernández-Piñas F. y Wolk C. P. (1998) A transposition-induced mutant of *Nostoc ellipsosporum* implicates an arginine-biosynthetic gene in the formation of cyanophycin granules and of functional heterocysts and akinetes. *Microbiology* 144: 1799-1805.
- Leonhardt, K. G. y Straus N. A. (1989) Sequence of the flavodoxin gene from *Anabaena variabilis* 7120. *Nucleic Acids Res.* 17: 4384.
- Li, J.-H., Laurent S., Konde V., Bédu S. y Zhang C.-C. (2003) An increase in the level of 2-oxoglutarate promotes heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbiology* 149: 3257-3263.
- Liang, J., Scappino L. y Haselkorn R. (1992) The *patA* gene product, which contains a region similar to CheY of *Escherichia coli*, controls heterocyst pattern formation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5655-5659.
- Liang, J., Scappino L. y Haselkorn R. (1993) The *patB* gene product, required for growth of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 under nitrogen-limiting conditions, contains ferredoxin and helix-turn-helix domains. *J. Bacteriol.* 175: 1697-1704.
- Liu, D. y Golden J. W. (2002) *hetL* overexpression stimulates heterocyst formation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 184: 6873-6881.
- Löffelhardt, W. y Bohnert, H. J. (1994) Molecular biology of cyanelles. En Bryant D. A. (ed), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 65-89.
- Lowry, O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Luque, I. y Forchhammer K. (2008) Nitrogen Assimilation and C/N Balance Sensing. En Herrero A. y Flores E. (eds), *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Caister Academic Press, Norfolk. pp 335-382.
- Luque, I., Contreras A., Zabulon G., Herrero A. y Houmard J. (2002) Expression of the glutamyl-tRNA synthetase gene from the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7942 depends on nitrogen availability and the global regulator NtcA. *Mol. Microbiol.* 46: 1157-1167.
- Luque, I., Flores E. y Herrero A. (1994) Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO J.* 13: 2862-2869.
- Luque, I., Vázquez-Bermúdez M. F., Paz-Yepes J., Flores E. y Herrero A. (2004) In vivo activity of the nitrogen control transcription factor NtcA is subjected to metabolic regulation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *FEMS Microbiol. Lett.* 236: 47-52.

## Bibliografía

- Luque, I., Zabulon G., Contreras A. y Houmard J. (2001) Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the stress-acclimation gene *nblA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol. Microbiol.* 41: 937-947.
- Lynn, M. E., Bantle J. A. y Ownby J. D. (1986) Estimation of gene expression in heterocysts of *Anabaena variabilis* by using DNA-RNA hybridization. *J. Bacteriol.* 167: 940-946.
- Mackinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140: 109-112.
- Mariscal, V., Herrero A. y Flores E. (2007) Continuous periplasm in a filamentous, heterocyst-forming cyanobacterium. *Mol. Microbiol.* 65: 1139-1145.
- Markwell, M. A., Haas S. M., Bieber L. L. y Tolbert N. E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87: 206-210.
- Marsh, J. L., Erfle M. y Wykes E. J. (1984) The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* 32: 481-485.
- Martínez-Argudo, I., Little R., Shearer N., Johnson P. y Dixon R. (2005) Nitrogen fixation: key genetic regulatory mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 152-156.
- Martín-Figueroa, E., Navarro F. y Florencio F. J. (2000) The GS-GOGAT pathway is not operative in the heterocysts. Cloning and expression of *glsF* gene from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett.* 476: 282-286.
- Masepohl, B., Görlitz K., Monnerjahn U., Mosler B. y Böhme H. (1997b) The ferredoxin-encoding *fdxN* gene of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 is not essential for nitrogen fixation. *New Phytol.* 136: 419-423.
- Masepohl, B., Scholisch K., Görlitz K., Kutzki C. y Böhme H. (1997a) The heterocyst-specific *fdxH* gene product of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is important but not essential for nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 253: 770-776.
- Matveyev, A. V., Rutgers E., Söderbäck E. y Bergman B. (1994) A novel genome rearrangement involved in heterocyst differentiation of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEMS Microbiol. Lett.* 116: 201-207.
- Meeks, J. C., Wolk C. P., Lockau W., Schilling N., Shaffer P. W. y Chien W.-S. (1978) Pathways of assimilation of  $[^{15}\text{N}]\text{N}_2$  and  $^{15}\text{NH}_4^+$  by cyanobacteria with and without heterocysts. *J. Bacteriol.* 134: 125-130.
- Misra, H. S. y Tuli R. (2000) Differential expression of photosynthesis and nitrogen fixation genes in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Physiol.* 122: 731-736.
- Moslavac, S., Bredemeier R., Mirus O., Granvogl B., Eichacker L. A. y Schleiff E. (2005) Proteomic analysis of the outer membrane of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Proteome Res.* 4: 1330-1338.
- Moslavac, S., Nicolaisen K., Mirus O., Al Dehni F., Pernil R., Flores E., Maldener I. y Schleiff E. (2007) A TolC-like protein is required for heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 189: 7887-7895.
- Mulligan, M. E. y Haselkorn R. (1989) Nitrogen fixation (*nif*) genes of the cyanobacterium *Anabaena* species strain PCC 7120. The *nifB-fdxN-nifS-nifU* operon. *J. Biol. Chem.* 264: 19200-19207.
- Mulligan, M. E., Buikema W. J. y Haselkorn R. (1988) Bacterial-type ferredoxin genes in the nitrogen fixation regions of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 and *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 170: 4406-4410.

- Muro-Pastor, A. M., Flores E., Herrero A. y Wolk C. P. (1992) Identification, genetic analysis and characterization of a sugar-non-specific nuclease from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 6: 3021-3030.
- Muro-Pastor, A. M., Kuritz T., Flores E., Herrero A. y Wolk C. P. (1994) Transfer of a genetic marker from a megaplasmid of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to a megaplasmid of a different *Anabaena* strain. *J. Bacteriol.* 176: 1093-1098.
- Muro-Pastor, A. M., Olmedo-Verd E. y Flores E. (2006) All4312, an NtcA-regulated two-component response regulator in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *FEMS Microbiol. Lett.* 256: 171-177.
- Muro-Pastor, A. M., Valladares A., Flores E. y Herrero A. (1999) The *hetC* gene is a direct target of the NtcA transcriptional regulator in cyanobacterial heterocyst development. *J. Bacteriol.* 181: 6664-6669.
- Muro-Pastor, A. M., Valladares A., Flores E. y Herrero A. (2002) Mutual dependence of the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global nitrogen regulator NtcA during heterocyst development. *Mol. Microbiol.* 44: 1377-1385.
- Muro-Pastor, M. I., Reyes J. C. y Florencio F. J. (2001) Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J. Biol. Chem.* 276: 38320-38328.
- Murray, N. E., Brammar W. J. y Murray K. (1977) Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. *Mol. Gen. Genet.* 150: 53-61.
- Murry, M. A., Olafsen, A. G y Benemann, J. R. (1981) Oxidation of diaminobenzidine in the heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *Curr. Microbiol.* 6: 201-206.
- Murry, M. y Wolk C. P. (1989) Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends upon two layers of the cell envelope. *Arch. Microbiol.* 151: 469-474.
- Neer, E. J., Schmidt C. J., Nambudripad R. y Smith T. F. (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371: 297-300.
- Neuer, G. y Böthe H. (1983) Anaplerotic reactions in *Anabaena cylindrica*. *FEBS Lett.* 158: 79-83.
- Ning, D. y Xu X. (2004) *alr0117*, a two-component histidine kinase gene, is involved in heterocyst development in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology* 150: 447-453.
- Onek, L. A. y Smith R. J. (1992) Calmodulin and calcium mediated regulation in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1039-1049.
- Oxelfelt, F., Tamagnini P. y Lindblad P. (1998) Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102. Cloning and characterization of a *hupSL* homologue. *Arch. Microbiol.* 169: 267-274.
- Palmer, B. R. y Marinus M. G. (1994) The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli*. *Gene* 143: 1-12.
- Papen, H., Neuer G., Refaian M. y Böthe H. (1983) The isocitrate dehydrogenase from cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 134: 73-79.
- Paz-Yepes, J., Flores E. y Herrero A. (2003) Transcriptional effects of the signal transduction protein P<sub>II</sub> (*glnB* gene product) on NtcA-dependent genes in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *FEBS Lett.* 543: 42-46.
- Picossi, S., Valladares A., Flores E. y Herrero A. (2004) Nitrogen-regulated genes for the metabolism of cyanophycin, a bacterial nitrogen reserve polymer: expression and mutational analysis of two cyanophycin synthetase and cyanophycinase gene clusters in heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J. Biol. Chem.* 279: 11582-11592.
- Potts, M., Angeloni S. V., Ebel R. E. y Bassam D. (1992) Myoglobin in a cyanobacterium. *Science* 256: 1690-1692.

## Bibliografía

- Ramasubramanian, T. S., Wei T.-F. y Golden J. W. (1994) Two *Anabaena* sp. strain PCC 7120 DNA-binding factors interact with vegetative cell- and heterocyst-specific genes. *J. Bacteriol.* 176: 1214-1223.
- Ramasubramanian, T. S., Wei T.-F., Oldham A. K. y Golden J. W. (1996) Transcription of the *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *ntcA* gene: multiple transcripts and NtcA binding. *J. Bacteriol.* 178: 922-926.
- Ramaswamy, K. S., Carrasco C. D., Fatma T. y Golden J. W. (1997) Cell-type specificity of the *Anabaena fdxN*-element rearrangement requires *xisH* and *xisl*. *Mol. Microbiol.* 23: 1241-1249.
- Ramírez, M. E., Hebbar P. B., Zhou R., Wolk C. P. y Curtis S. E. (2005) *Anabaena* sp. strain PCC 7120 gene *devH* is required for synthesis of the heterocyst glycolipid layer. *J. Bacteriol.* 187: 2326-2331.
- Ran, L., Huang F., Ekman M., Klint J. y Bergman B. (2007) Proteomic analyses of the photoauto- and diazotrophically grown cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 73102. *Microbiology* 153: 608-618.
- Razquin, P., Fillat M. F., Schmitz S., Stricker O., Böhme H., Gómez-Moreno C. y Peleato M. L. (1996) Expression of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase in heterocysts from *Anabaena* sp. *Biochem. J.* 316: 157-160.
- Razquin, P., Schmitz S., Fillat M. F., Peleato M. L. y Böhme H. (1994) Transcriptional and translational analysis of ferredoxin and flavodoxin under iron and nitrogen stress in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 176: 7409-7411.
- Reade, J. P., Dougherty L. J., Rogers L. J. y Gallon J. R. (1999) Synthesis and proteolytic degradation of nitrogenase in cultures of the unicellular cyanobacterium *Gloeotheca* strain ATCC 27152. *Microbiology* 145: 1749-1758.
- Rippka, R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M. y Stanier R. Y. (1979) Generic assignments, strain stories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.
- Risser, D. D. y Callahan S. M. (2007) Mutagenesis of *hetR* reveals amino acids necessary for HetR function in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 189: 2460-2467.
- Robson, R. L. y Postgate J. R. (1980) Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annu. Rev. Microbiol.* 34: 183-207.
- Sambrook, J. y Russell D. W. (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sánchez-Baracaldo, P., Hayes P. K. y Blank C. E. (2005) Morphological and habitat evolution in the cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology* 3: 145-166.
- Sanger, F., Nicklen S. y Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sauer, J., Dirmeier U. y Forchhammer K. (2000) The *Synechococcus* strain PCC 7942 *glnN* product (glutamine synthetase III) helps recovery from prolonged nitrogen chlorosis. *J. Bacteriol.* 182: 5615-5619.
- Sazuka, T. (2003) Proteomic analysis of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 with two-dimensional gel electrophoresis and amino-terminal sequencing. *Photosynthesis Res.* 78: 279-291.
- Schmetterer, G. (1994) Cyanobacterial respiration. En Bryant D. A. (ed), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 409-435.



- Schmitz, S., Schrautemeier B. y Böhme H. (1993) Evidence from directed mutagenesis that positively charged amino acids are necessary for interaction of nitrogenase with the [2Fe-2S] heterocyst ferredoxin (FdxH) from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Mol. Gen. Genet.* 240: 455-460.
- Schneider, G. J., Lang J. D. y Haselkorn R. (1991) Promoter recognition by the RNA polymerase from vegetative cells of the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Gene* 105: 51-60.
- Schneider, G. J., Tumer N. E., Richaud C., Borbely G. y Haselkorn R. (1987) Purification and characterization of RNA polymerase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* 262: 14633-14639.
- Schopf, J. W. y Parcker B. M. (1987) Early archaean (3.3 billion to 3.5 billion-years-old) microfossils from Waranoona group, Australia. *Science* 237:70-73
- Schopf, J. W. y Walter M. R. (1982) Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence. En Carr N. G. y Whitton B. A. (eds), *The Biology of Cyanobacteria*. Blackwell Scientific, Oxford. pp 543-564.
- Schrautemeier, B. y Böhme H. (1985) A distinct ferredoxin for nitrogen fixation isolated from heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEBS Lett.* 184: 304-308.
- Sherman, D. M., Tucker D. y Sherman L. A. (2000) Heterocyst development and localization of cyanophycin in N<sub>2</sub>-fixing cultures of *Anabaena* sp. PCC 7120 (cyanobacteria). *J. Phycol.* 36: 932-941.
- Shi, Y., Zhao W., Zhang W., Ye Z. y Zhao J. (2006) Regulation of intracellular free calcium concentration during heterocyst differentiation by HetR and NtcA in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 11334-11339.
- Simon, R. D. (1987) Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies. En Fay P. y Van Baalen (eds), *The Cyanobacteria*. Elsevier Science Publishers B. V., New York. pp 119-225.
- Smith, R. J., Hobson, S. y Ellis, I. R. (1987) Evidence for calcium-mediated regulation of heterocyst frequency and nitrogenase activity in *Nostoc* 6720. *New Phytol.* 105: 531-541.
- Smith, R. J. y Wilkins A. (1988) A correlation between intracellular calcium and incident irradiance in *Nostoc* 6720. *New Phytol.* 109: 157-161.
- Stanier, R. Y. y Cohen-Bazire G. (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 31: 225-274.
- Stanne, T. M., Pojidaeva E., Andersson F. I. y Clarke A. K. (2007) Distinctive types of ATP-dependent Clp proteases in cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* 282: 14394-14402.
- Stensjö, K., Ow S. Y., Barrios-Llerena M. E., Lindblad P. y Wright P. C. (2007) An iTRAQ-based quantitative analysis to elaborate the proteomic response of *Nostoc* sp. PCC 7120 under N<sub>2</sub> fixing conditions. *J. Proteome R.* 6: 621-635.
- Stewart, W. D. y Codd G. A. (1975) Polyhedral bodies (carboxysomes) of nitrogen-fixing blue-green algae. *Br. Phycol. J.* 10: 273-278.
- Stewart, W. D., Fitzgerald G. P. y Burris R. H. (1967) In situ studies on nitrogen fixation with the acetylene reduction technique. *Science* 158: 536.
- Studier, F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J. y Dubendorff J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89.
- Summers, M. L., Wallis J. G., Campbell E. L. y Meeks J. C. (1995) Genetic evidence of a major role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133. *J. Bacteriol.* 177: 6184-6194.

## Bibliografía

- Tamagnini, P., Axelsson R., Lindberg P., Oxelfelt F., Wunschiers R. y Lindblad P. (2002) Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 1-20.
- Tandeau de Marsac, N. y Houmard J. (1993) Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 119-190.
- Tanigawa, R., Shirokane M., Maeda S.-I., Omata T., Tanaka K. y Takahashi H. (2002) Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4251-4255.
- Thiel, T. y Pratte B. (2001) Effect on heterocyst differentiation of nitrogen fixation in vegetative cells of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *J. Bacteriol.* 183: 280-286.
- Thomas, J., Meeks J. C., Wolk C. P., Shaffer P. W., Austin S. M. y Chien W. S. (1977) Formation of glutamine from [<sup>13</sup>N]ammonia, [<sup>13</sup>N]dinitrogen, and [<sup>14</sup>C]glutamate by heterocysts isolated from *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* 129: 1545-1555.
- Tomitani, A., Knoll A. H., Cavanaugh C. M. y Ohno T. (2006) The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 5442-5447.
- Torrecilla, I., Leganés F., Bonilla I. y Fernández-Piñas F. (2004) A calcium signal is involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Microbiology* 150: 3731-3739.
- Tumer, N. E., Robinson S. J. y Haselkorn R. (1983) Different promoters for the *Anabaena* glutamine synthetase gene during growth using molecular of fixed nitrogen. *Nature* 306: 337-342.
- Turner, S., Pryer K. M., Miao V. P. y Palmer J. D. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46: 327-338.
- Valladares, A., Herrero A., Pils D., Schmetterer G. y Flores E. (2003) Cytochrome c oxidase genes required for nitrogenase activity and diazotrophic growth in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 47: 1239-1249.
- Valladares, A., Maldener I., Muro-Pastor A. M., Flores E. y Herrero A. (2007) Heterocyst development and diazotrophic metabolism in terminal respiratory oxidase mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 189: 4425-4430.
- Valladares, A., Muro-Pastor A. M., Fillat M. F., Herrero A. y Flores E. (1999) Constitutive and nitrogen-regulated promoters of the *petH* gene encoding ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reductase in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *FEBS Lett.* 449: 159-164.
- Valladares, A., Muro-Pastor A. M., Herrero A. y Flores E. (2004) The NtcA-dependent P<sub>1</sub> promoter is utilized for *glnA* expression in N<sub>2</sub>-fixing heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 186: 7337-7343.
- Vázquez-Bermúdez, M. F., Flores E. y Herrero A. (2002a) Analysis of binding sites for the nitrogen-control transcription factor NtcA in the promoters of *Synechococcus* nitrogen-regulated genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1578: 95-98.
- Vázquez-Bermúdez, M. F., Herrero A. y Flores E. (2000) Uptake of 2-oxoglutarate in *Synechococcus* strains transformed with the *Escherichia coli* *kgtP* gene. *J. Bacteriol.* 182: 211-215.
- Vázquez-Bermúdez, M. F., Herrero A. y Flores E. (2002b) 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus* *glnA* promoter. *FEBS. Lett.* 512: 71-74.

- Vázquez-Bermúdez, M. F., Herrero A. y Flores E. (2003) Carbon supply and 2-oxoglutarate effects on expression of nitrate reductase and nitrogen-regulated genes in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 155-159.
- Vázquez-Bermúdez, M. F., Paz-Yepes J., Herrero A. y Flores E. (2002c) The NtcA-activated *amt1* gene encodes a permease required for uptake of low concentrations of ammonium in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Microbiology* 148: 861-869.
- Vioque, A. (1997) The RNase P RNA from cyanobacteria: short tandemly repeated repetitive (STRR) sequences are present within the RNase P RNA gene in heterocyst-forming cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* 25: 3471-3477.
- Walsby, A. E. (1985) The permeability of heterocysts to the gases nitrogen and oxygen. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 226: 345-366.
- Walsby, A. E. (2007) Cyanobacterial heterocysts: terminal pores proposed as sites of gas exchange. *Trends Microbiol.* 15: 340-349.
- Wei, T.-F., Ramasubramanian T. S. y Golden J. W. (1994) *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *ntcA* gene required for growth on nitrate and heterocyst development. *J. Bacteriol.* 176: 4473-4482.
- Wildon, D. C. y Mercer F. V. (1963) The ultrastructure of the heterocyst and akinete of the blu-algae. *Arch. Microbiol.* 47: 19-31.
- Wilmotte, A. (1994) Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. En Bryant D. A. (ed), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 2-25.
- Winkenbach, F. y Wolk C. P. (1973) Activities of enzymes of the oxidative and the reductive pentose phosphate pathways in heterocysts of a blue-green algae. *Plant. Physiol.* 52: 480-483.
- Wisén, S., Bergman B. y Mannervik B. (2004) Mutagenesis of the cysteine residues in the transcription factor NtcA from *Anabaena* PCC 7120 and its effects on DNA binding in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1679: 156-163.
- Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Wolk, C. P. (1968) Movement of carbon from vegetative cells to heterocysts in *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* 96: 2138-2143.
- Wolk, C. P. (1980) Cyanobacteria (blue-green algae). En Tolbert N. E. (ed), *The Biochemistry of Plants*. Academic Press Inc., New York. pp 659-687
- Wolk, C. P. (1982) Heterocysts. En Carr, N. G. y Whitton, B. A. (eds), *The Biology of Cyanobacteria*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England. pp 359-386.
- Wolk, C. P., Cai Y. y Panoff J. M. (1991) Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5355-5359.
- Wolk, C. P. (1996) Heterocyst formation. *Annu. Rev. Genet.* 30: 59-78.
- Wolk, C. P. (2000) Heterocyst formation in *Anabaena*. En Brun, Y. V. y Shimkets, L. J. (eds), *Prokaryotic Development*. American Society for Microbiology, Washington DC. pp 83-104.
- Wolk, C. P. (2005) Developmental Biology of Nitrogen-Fixing Cyanobacteria. Annual report, MSU-DOE Plant Research Laboratory. pp 81-90.
- Wolk, C. P., Cai Y., Cardemil L., Flores E., Hohn B., Murry M., Schmetterer G., Schrautemeier B. y Wilson R. (1988) Isolation and complementation of mutants of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 unable to grow aerobically on dinitrogen. *J. Bacteriol.* 170: 1239-1244.

## Bibliografía

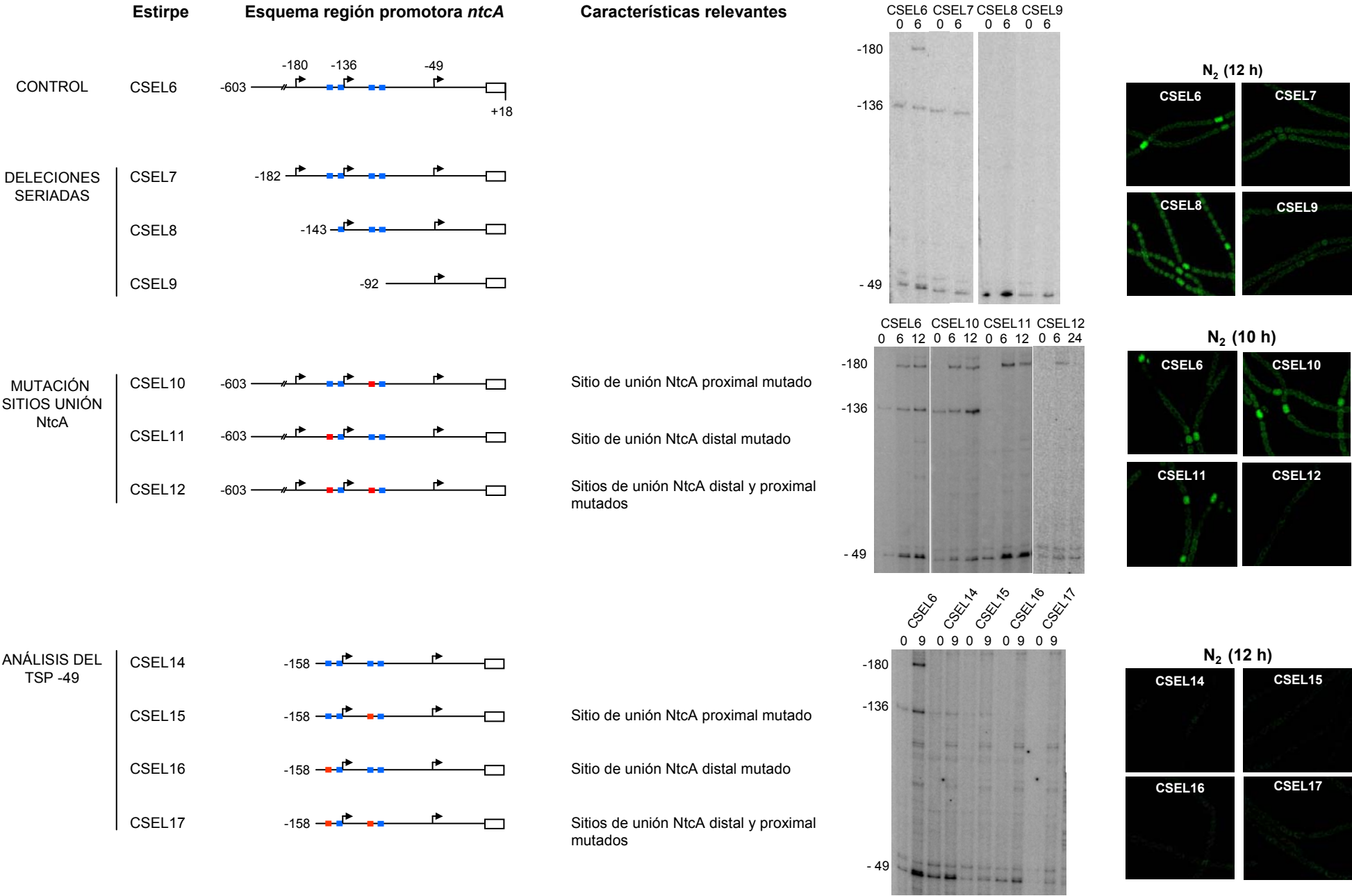
- Wolk, C. P., Ernst A. y Elhai J. (1994) Heterocyst metabolism and development. En Bryant D. A. (ed), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 769-823.
- Wong, F. C. y Meeks J. C. (2001) The *hetF* gene product is essential to heterocyst differentiation and affects HetR function in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *J. Bacteriol.* 183: 2654-2661.
- Wong, F. C. y Meeks J. C. (2002) Establishment of a functional symbiosis between the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* and the bryophyte *Anthoceros punctatus* requires genes involved in nitrogen control and initiation of heterocyst differentiation. *Microbiology* 148: 315-323.
- Wood, N. B. y Haselkorn R. (1976) Protein degradation during heterocyst development in *Anabaena*. En Codd G. A. y Stewart W. D. P. (eds), *Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Symp. Photosynth. Prokaryotes*, Dundee, Scotland.
- Wu, X., Lee D. W., Mella R. A. y Golden J. W. (2007) The *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *asr1734* gene encodes a negative regulator of heterocyst development. *Mol. Microbiol.* 64: 782-794.
- Xu, X., Elhai J. y Wolk P. (2008) Transcriptional and Developmental Responses by *Anabaena* to Deprivation of Fixed Nitrogen. En Herrero A. y Flores E. (eds), *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Caister Academic Press, Norfolk. pp 383-422.
- Xu, X., Khudyakov I. y Wolk C. P. (1997) Lipopolysaccharide dependence of cyanophage sensitivity and aerobic nitrogen fixation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 179: 2884-2891.
- Yamanaka, G. y Glazer A. N. (1983) Phycobiliproteins in *Anabaena* 7119. En Papageorgiou G. L y Packer L. (eds), *Photosynthetic prokaryotes: cell differentiation and function*. Elsevier Science Publishers B. V., New York. pp 69-94.
- Yoon, H.-S. y Golden J. W. (1998) Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide. *Science* 282: 935-938.
- Yoon, H.-S. y Golden J. W. (2001) PatS and products of nitrogen fixation control heterocyst pattern. *J. Bacteriol.* 183: 2605-2613.
- Yoshimura, H., Okamoto S., Tsumuraya Y. y Ohmori M. (2007) Group 3 sigma factor gene, *sigJ*, a key regulator of desiccation tolerance, regulates the synthesis of extracellular polysaccharide in cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Research* 14: 13-24.
- Zhang, C.-C., Friry A. y Peng L. (1998) Molecular and genetic analysis of two closely linked genes that encode, respectively, a protein phosphatase 1/2A/2B homolog and a protein kinase homolog in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 180: 2616-2622.
- Zhang, C.-C. y Libs L. (1998) Cloning and characterisation of the *pknD* gene encoding an eukaryotic-type protein kinase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Gen. Genet.* 258: 26-33.
- Zhang, Y., Pu H., Wang Q., Cheng S., Zhao W., Zhang Y. y Zhao J. (2007) PII is important in regulation of nitrogen metabolism but not required for heterocyst formation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J. Biol. Chem.* 282: 33641-33648.
- Zhao, J. LaClaire, J. W y Brand, J. J. (1991) Calcium and heterocyst development in *Anabaena* 7120. En *VII International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes*, University of Massachusetts, Amherst, USA.

- Zhao, Y., Shi Y., Zhao W., Huang X., Wang D., Brown N., Brand J. y Zhao J. (2005) CcbP, a calcium-binding protein from *Anabaena* sp. PCC 7120, provides evidence that calcium ions regulate heterocyst differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 5744-5748.
- Zhou, R. y Wolk C. P. (2003) A Two-component system mediates developmental regulation of biosynthesis of a heterocyst polysaccharide. *J. Biol. Chem.* 278: 19939-19946.
- Zhou, R., Cao Z. y Zhao J. (1998a) Characterization of HetR protein turnover in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Arch. Microbiol.* 169: 417-423.
- Zhou, R., Wei X., Jiang N., Li H., Dong Y., Hsi K.-L. y Zhao J. (1998b) Evidence that HetR protein is an unusual serine-type protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4959-4963.
- Zhu, J., Jager K., Black T., Zarka K., Koksharova O. y Wolk C. P. (2001) HcwA, an autolysin, is required for heterocyst maturation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 183: 6841-6851.
- Zhu, J., Kong R. y Wolk C. P. (1998) Regulation of *hepA* of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 by elements 5' from the gene and by *hepK*. *J. Bacteriol.* 180: 4233-4242.
- Ziegler, K., Stephan D. P., Pistorius E. K., Ruppel H. G. y Lockau W. (2001) A mutant of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 lacking cyanophycin synthetase: growth properties and ultrastructural aspects. *FEMS Microbiol. Lett.* 196: 13-18.



ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE *ntcA* DE *Anabaena* sp. PCC 7120

FUSIONES TRADUCCIONALES DEL GEN TESTIGO *gfp* CON VERSIONES ALTERADAS DEL P<sub>*ntcA*</sub> INTRODUCIDAS EN LA PLATAFORMA *nucA*



## ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE *ntcA* DE *Anabaena* sp. PCC 7120

### FUSIONES TRADUCCIONALES DEL GEN TESTIGO *gfp* CON VERSIONES ALTERADAS DEL P<sub>*ntcA*</sub> INTRODUCIDAS EN LA PLATAFORMA *nucA*

#### CSEL6/10/11/12

ATC GATTTCATTGTACAGCTTGACAGAAATCACTACCCAGTAGAAGAGGTAATCAAGCTATGTTGGGAATTTTCTTGCTGTTTAACTCGAAAGAATGTCTAGGGGACAGGA  
GGAGAGCAAGAGAGGCAAGGTAGGCCAGGGAGGAAAGAGGTTTCTTTTCCCCCTTACTCAAGAACAGCCTGCCTGAACCAAGATAGGACTTAGGCAATCT  
ATACCCCTATACCCCTATACCCCTATACCCCTATACCCCTTATCCAAACCCTTTATCTTTGTTTATACATGGTTAGCAAAAATGATGATTATTAAGGGCGTTTTTTAGAATAAA  
ATGTTTGTTATTCTTAAGATATTTCAAGATTACTTAATTTTTCTGCAAAAAACCTGATGGTTAGAGAAAGTAGAAGTATCTATC AAGAACTGCTAGCTAAAAATAGCAAAA  
GTTGGGTAATCATATGAAACAAATAACCATAAAGTTGTACGTTTGAATAGGAAAGTACAGAAAGGTTAACGGTGCTTTATTGATTTTTCAGGTGATTCTTAGGTAATTAG  
TTTTTAGTTTTTTGTTATTCCGGCATTGGGTAGGGGAAGGGAGATGATCGTGACACAAG

-251  
-136  
-180  
-87  
-49  
-10  
-35  
-10  
+1

#### Región promotora de *ntcA*

Se indican las posibles cajas -10 y -35 (subrayado), los hemisitos de los sitios de unión de NtcA (cajas grises), el codón de inicio de la traducción (+1) y los sitios de inicio de la transcripción (-49, -136 y -180). También se señala la región promotora de *ntcA* (extremo 5') que está fusionada transcripcionalmente con el gen testigo *gfp* en cada estirpe mutante (en rojo), así como otras posiciones de interés en la interpretación de los resultados (azul).